美国现代食品科技系列 8

现代食品微生物学

（第五版）

[美] James M.Jay 编著 · 徐岩 张娜民 陆丹剑 等译

MODERN FOOD MICROBIOLOGY

中国轻工业出版社
CHINA LIGHT INDUSTRY PRESS

美国现代食品科技系列（8）

现代食品微生物学

（第五版）

〔美〕James M. Jay 编著
徐岩 张继民 汤丹剑 等译

中国轻工业出版社

图书在版编目（CIP）数据

现代食品微生物学（第五版）/（美）杰伊（Jay，J.M.）编著；徐岩，张继民，汤丹剑等译．—北京：中国轻工业出版社，2001.7
（美国现代食品科技系列）
ISBN 7-5019-2603-4

Ⅰ.现… Ⅱ.①杰… ②徐… ③张… ④汤… Ⅲ.食品-微生物学 Ⅳ.TS201.3

中国版本图书馆 CIP 数据核字（2001）第 026678 号

《现代食品微生物学》（第五版 James M. Jay）一书的中文版经英文版所有者 ASPEN PUBLISHERS，INC.，Gaithersburg，Maryland，U.S.A. 许可，由中国轻工业出版社出版发行。版权所有，翻印必究。

责任编辑：熊慧珊 杨运峻
策划编辑：李炳华 李亦兵 责任终审：滕炎福 封面设计：赵小云
版式设计：丁 夕 责任校对：李 靖 责任监印：胡 兵

*

出版发行：中国轻工业出版社（北京东长安街 6 号，邮编：100740）
网 址：http://www.chlip.com.cn
联系电话：010－65241695
印 刷：中国人民警官大学印刷厂
经 销：各地新华书店
版 次：2001 年 7 月第 1 版 2001 年 7 月第 1 次印刷
开 本：787×1092 1/16 印张：38
字 数：878 千字 印数：1—4000
书 号：ISBN 7-5019-2603-4/TS·1589
定 价：75.00 元
著作权合同登记 图字：01-1999-2754

·如发现图书残缺请直接与我社发行部联系调换·

前　言

正如前四版那样，在第五版《现代食品微生物学》中特别强调食品传播的微生物。目前，很好地理解食品传播的微生物的生理学基础要比过去的几十年显得更加重要。20世纪90年代以来，随着许多微生物学家对基因和分子学的关注，编写本书的目的之一就是要提供一本不仅强调微生物的基因和分子学内容，而且要涉及整个微生物细胞的著作。

对于本书的使用，这一版最适合作为微生物学辅助或后续课程使用。显然有机化学课程是学习这本书的前提，但是对于较好地掌握了普通生物学和化学的读者来讲，学习本书应该是不会有困难的。本书除了可以作为教科书外，与前几版一样，这一版包含的内容超出了一个学期的课程内容。

作为食品微生物学的教科书，作者建议从涉及食品微生物的来源及类型的第二部分以及概述原理的第三部分开始。关于食品产品的内容，则尽可能扩大范围，但在整本书覆盖面中，必须强调第二部分的原理部分。按照逻辑，接下来是第五部分关于食品的保藏方法，其中还会再次出现第二部分中的某些原理。在特殊食品微生物学的第三部分，读者还可以了解到有关食品的生物群以及微生物是如何引起腐败的知识。对于这一点，很明显地要谈到食品中微生物的生长、食品的微生物腐败和影响生物控制的方法。关于检测、计数的许多方法安排在第四部分，其后是食品的质量控制和食品安全性的实践与原理。这些都需要应用指标性微生物和危害分析关键控制点体系（HACCP），这部分内容在第六部分。按照前面的方法，在很好地理解了食品传播的生物学和它们与食品系统的相互关系之后，还应该了解本书专述的食品传播的病原菌（第七部分）。

对于大多数三个学分的课程和二至三个学分的实验室课程来讲，只能占本书内容的75%～80%。本书包括七个部分，其中六个部分的概述部分所用参考资料比其后正文的参考资料更为广泛。这主要是为提供给用本书作教科书的读者。

在编写这本书时，查阅了许多参考资料。我要感谢许多查阅资料的人员，因为我引用了许多他们的查阅结果。特别感谢对我的初稿的各个部分提出建议的下列各位，他们是：G. R. Acuff，M. A. Cousin，C. E. Deutch，D. L. Haldeman，M. P. Jackson，J. B. Luchansky，J. T. Rudrik 和 P. M. Steubing。对于在前四版每个版本中给予过帮助的朋友，在此一并表示感谢。

译 者 的 话

食品微生物学是研究涉及到食品中微生物的存在、活动及其控制的各种基本因素的一门科学。《现代食品微生物学》一书系统地介绍了食品微生物学的历史、食品微生物及其生长的基本知识，以及新鲜肉类、发酵和加工肉类、家禽、海鲜、乳制品、水果、蔬菜等其它产品中的特殊微生物；食品中微生物的检测方法；食品的保藏方法；食品的安全性及质量控制以及由食品传播的疾病等食品微生物方方面面的知识。

James M. Jay 是美国内华达大学生物科学系的教授和微生物学家以及缅因州立大学的名誉教授。他的这本《现代食品微生物学》自从 1978 年第一版以来，二十多年中已经再版了五次，在美国是一本具有极高学术价值的食品微生物的经典著作。这本书是第一次全面地与我国读者见面。本书在食品微生物及其产物的鉴定中不仅介绍了大量微生物培养、观察、取样和鉴定的新思路与新方法，包括近些年发展起来的分子生物学（如指纹识别、聚合酶链式反应技术等）和免疫学的新方法，而且涉及动物分析、细胞培养等生物分析及相关技术。同时，对食品生产的安全性控制的 HACCP 系统也有详细的阐述。因此，《现代食品微生物学》可以作为食品科学、食品工程、食品营养、微生物学、生物学和生物系的学生在学习“食品微生物学”课程时的一本理想的教学参考书。作为 Aspen 食品科学系列科技类图书，《现代食品微生物学》也是为从事食品以及相关学科和行业从事研究、教学和产业开发的人们全面系统地提供了一本介绍食品微生物学原理和影响食品微生物的因素的有价值的实践性较高的书籍。

面对到来的 21 世纪，我国食品工业将随着我国改革开放的不断深入，国民经济持续、快速、健康地发展而呈现出蓬勃发展的趋势。如果《现代食品微生物学》的翻译出版能够对我国食品工业的技术发展有所助益的话，这将是对将近二年辛勤工作的最大的肯定和鼓励。

本书由无锡轻工大学生物工程学院徐岩博士，安徽芜湖机电学院的张继民副教授、宁波大学的汤丹剑副教授主译，参与部分章节翻译工作的还有无锡轻工大学生物工程学院张丽萍、聂尧和穆晓清等同志，感谢他（她）们的支持与帮助。

无锡轻工大学生物工程学院　徐岩

目　录

第一部分　历史背景 …… (1)

1. 食品微生物的历史 …… (1)

1.1　发展的历史 …… (3)

参考文献 …… (7)

第二部分　分布、分类和生长参数 …… (8)

2. 食品微生物的分类、作用和重要性 …… (8)

2.1　细菌的分类 …… (9)

2.2　食品中微生物的主要来源 …… (11)

2.3　食品中常见的细菌概要 …… (14)

2.4　食品中常见的霉菌属概要 …… (19)

2.5　食品中常见的酵母属概要 …… (24)

参考文献 …… (27)

3. 影响微生物生长的食品内在和外在因素 …… (31)

3.1　内在因素 …… (31)

3.2　外在因素 …… (44)

3.3　内、外在因素的联合作用：跳越概念 …… (51)

参考文献 …… (52)

第三部分　食品中的微生物 …… (59)

4. 鲜肉和家禽 …… (59)

4.1　僵直的生化反应 …… (59)

4.2　肉和禽中的微生物 …… (60)

4.3　鲜肉中微生物存在的偶然性和普遍性 …… (62)

4.4　新鲜红肉的微生物腐败 …… (67)

4.5　新鲜肝脏的腐败 …… (75)

4.6　鲜禽中微生物存在的偶然性和普遍性 …… (76)

4.7　家禽的微生物腐败 …… (77)

4.8　屠宰后动物胴体的清洗和消毒 …… (79)

参考文献 …… (79)

5. 肉、禽制品 …… (86)

5.1　气调包装和真空包装…… (86)
5.2　香肠、腊肉、波罗纳香肠和相关的肉制品…… (94)
5.3　腊肉和腌制火腿…… (97)
5.4　发酵肉制品…… (98)
参考文献…… (101)
6. 水产品 …… (107)
6.1　各种新鲜及冷冻水产品的微生物特性 …… (107)
6.2　发酵鱼类 …… (110)
6.3　鱼和贝类的腐败 …… (110)
参考文献…… (116)
7. 发酵作用与发酵乳制品 …… (119)
7.1　发酵作用 …… (119)
7.2　乳制品 …… (124)
7.3　发酵乳明确了的保健功能 …… (128)
7.4　乳酸菌导致的疾病 …… (131)
参考文献…… (131)
8. 新鲜和发酵果蔬产品 …… (135)
8.1　新鲜和冷冻蔬菜 …… (135)
8.2　水果的腐烂 …… (145)
8.3　发酵产品 …… (146)
8.4　各类发酵制品 …… (154)
参考文献…… (157)
9. 各类食品 …… (163)
9.1　熟食及相关食品 …… (163)
9.2　鸡蛋 …… (165)
9.3　蛋黄酱和沙拉调料 …… (166)
9.4　谷物、面粉和面团制品 …… (167)
9.5　焙烤制品 …… (168)
9.6　冷冻肉馅饼 …… (168)
9.7　糖、糖果和香料 …… (168)
9.8　果仁 …… (169)
9.9　脱水食品 …… (170)
9.10　肠道营养液（医疗食品）…… (170)
9.11　单细胞蛋白…… (171)
参考文献…… (173)
第四部分　食品中微生物及其产物的鉴定 …… (177)
10. 培养、显微观测和取样方法 …… (177)

10.1　传统的 SPC 方法 …… (178)
10.2　膜过滤 …… (180)
10.3　显微镜菌落计数法 …… (182)
10.4　琼脂滴计数法 …… (182)
10.5　干燥薄膜计数法 …… (183)
10.6　最近似数测定法 …… (183)
10.7　染色还原计数法 …… (184)
10.8　滚动试管计数法 …… (184)
10.9　显微直接计数法 …… (185)
10.10　霍华德霉菌计数法 …… (185)
10.11　表层微生物的检测 …… (185)
10.12　代谢受破坏的微生物 …… (188)
10.13　不可生长的活性微生物 …… (191)
参考文献 …… (191)
11. 物理、化学、分子和免疫方法 …… (199)
11.1　物理方法 …… (199)
11.2　化学方法 …… (203)
11.3　食品微生物的“指纹”识别和鉴定 …… (209)
11.4　免疫学方法 …… (216)
参考文献 …… (222)
12. 生物分析及相关技术 …… (234)
12.1　动物分析实验 …… (235)
12.2　动物实验中的外科手术处理技术 …… (238)
12.3　细胞培养体系 …… (239)
参考文献 …… (243)
第五部分　食品的保藏及嗜冷、嗜热、抗辐射细菌的特性 …… (247)
13. 食品的化学保藏 …… (247)
13.1　苯甲酸和对羟基苯甲酸酯 …… (248)
13.2　山梨酸 …… (249)
13.3　丙酸盐 …… (251)
13.4　SO_2 和硫酸盐 …… (251)
13.5　硝酸盐和亚硝酸盐 …… (252)
13.6　食盐和糖 …… (257)
13.7　间接抗菌剂 …… (258)
13.8　乙酸和乳酸 …… (262)
13.9　抗生素 …… (262)
13.10　水果的抗真菌剂 …… (267)

13.11　乙烯和丙烯氧化物 …… (268)
13.12　其它各种化学防腐剂 …… (269)
参考文献 …… (270)
14. 食品辐射保藏与微生物的耐辐射特性 …… (278)
14.1　不同射线在食品保藏中的辐射特点 …… (278)
14.2　各种辐射对微生物致死作用的基本原理 …… (279)
14.3　食品辐射处理的工艺过程 …… (281)
14.4　射线的应用 …… (282)
14.5　食品的辐射完全灭菌、辐射针对性灭菌和辐射选择性灭菌 …… (283)
14.6　食品辐射的法律规范 …… (290)
14.7　辐射对食品质量的影响 …… (290)
14.8　辐射食品贮藏稳定性 …… (292)
14.9　微生物的耐辐射特性 …… (292)
参考文献 …… (295)
15. 食品低温保藏及适冷菌的特性 …… (301)
15.1　定义 …… (301)
15.2　最低生长温度 …… (302)
15.3　冻藏食品的预处理 …… (304)
15.4　食品的冷冻和冷冻效果 …… (304)
15.5　冷冻食品的贮存稳定性 …… (305)
15.6　冷冻对微生物的影响 …… (306)
15.7　一些嗜冷菌和适冷菌（Psychrotrophs）的特性 …… (309)
15.8　低温对微生物生理机能的影响 …… (311)
15.9　低耐热性适冷菌的性质 …… (313)
参考文献 …… (314)
16. 食品高温保藏及嗜热微生物的特性 …… (319)
16.1　影响微生物耐热性的因素 …… (320)
16.2　微生物的相对耐热性 …… (324)
16.3　微生物的热致死作用 …… (325)
16.4　热-超声波协同作用（manother mosonication，或 MTS） …… (328)
16.5　无菌包装 …… (329)
16.6　嗜热菌的一些特性 …… (330)
16.7　嗜热菌的其它有关方面 …… (332)
16.8　罐头食品的腐败 …… (334)
参考文献 …… (337)
17. 食品干燥保藏 …… (341)
17.1　低水分食品的干燥和制作 …… (341)
17.2　干燥对微生物的作用 …… (342)

17.3　干燥食品的贮存稳定性……（344）
17.4　半干食品（IMF）……（345）
17.5　IMF 和玻璃态转变……（350）
参考文献……（351）

第六部分　食品安全的微生物指标、质量控制原理和微生物标准……（354）

18. 食品微生物质量和安全性指标……（354）
18.1　产品质量指标……（354）
18.2　食品安全性指标……（356）
18.3　预测微生物学/微生物模型……（369）
参考文献……（369）
19. HACCP 体系和食品安全性……（374）
19.1　危害分析关键控制点体系（HACCP）……（374）
19.2　微生物指标……（381）
参考文献……（387）

第七部分　食物传染的疾病……（390）

20. 葡萄球菌胃肠炎……（390）
20.1　食物中有关的菌种……（391）
20.2　生态和分布……（393）
20.3　食物中的发生率……（394）
20.4　生长的营养需求……（394）
20.5　生长温度范围……（394）
20.6　食盐和其它化学剂的影响……（394）
20.7　pH、水分活度和其它参数的影响……（395）
20.8　葡萄球菌肠毒素：类型和发生率……（396）
20.9　胃肠炎综合征……（404）
20.10　发生率与含毒食品……（404）
20.11　金黄色葡萄球菌的生长与生态……（405）
20.12　葡萄球菌中毒和其它食物中毒综合征的预防……（406）
参考文献……（406）
21. 革兰氏阳性产孢子细菌食物中毒……（413）
21.1　产气荚膜梭菌食物中毒……（413）
21.2　肉毒梭菌食物中毒……（420）
21.3　蜡状杆菌胃肠炎……（431）
参考文献……（433）
22. 食物起因的李斯特菌病……（441）
22.1　李斯特菌的分类……（441）

22.2　生长……（444）
22.3　分布……（447）
22.4　耐热性……（449）
22.5　毒素性质……（452）
22.6　试验动物与感染剂量……（455）
22.7　李斯特菌病综合征的发生率和特征……（456）
22.8　对李斯特菌病的抗性……（459）
22.9　食品中的产单核细胞李斯特菌……（460）
22.10　与产单核细胞李斯特菌有关的食品法规……（461）
参考文献……（462）
23. 沙门氏菌和志贺氏菌食物中毒胃肠炎……（471）
23.1　沙门氏菌病……（471）
23.2　志贺氏菌病……（484）
参考文献……（487）
24. 大肠杆菌食物中毒胃肠炎……（491）
24.1　血清学分类……（491）
24.2　已知的毒性组……（491）
参考文献……（503）
25. 弧菌、耶尔森氏菌和弯曲菌食物中毒胃肠炎……（509）
25.1　弧菌病（副溶血弧菌）……（509）
25.2　其它弧菌……（512）
25.3　耶尔森氏菌病（小肠结肠炎耶尔森氏菌）……（516）
25.4　弯曲菌病（空肠弯曲菌）……（521）
25.5　预防……（523）
参考文献……（524）
26. 食品中的动物寄生虫……（532）
26.1　原生动物……（532）
26.2　扁形虫……（541）
26.3　圆形虫……（547）
参考文献……（554）
27. 真菌毒素……（559）
27.1　黄曲霉毒素……（559）
27.2　链格孢毒素……（564）
27.3　橘霉素……（565）
27.4　赭曲霉毒素……（566）
27.5　棒曲霉素……（566）
27.6　青霉酸……（567）
27.7　柄曲霉素……（568）

27.8　镰孢霉素……（568）
27.9　接骨木镰孢毒素……（571）
27.10　玉米镰孢酮……（572）
参考文献……（572）
28. 病毒和其它食品中的生物危害……（577）
28.1　病毒……（577）
28.2　与组胺（鲭鱼）有关的中毒……（582）
28.3　致麻痹性贝类中毒……（584）
28.4　气单胞菌、邻单胞菌和类杆菌……（585）
参考文献……（587）
附录……（592）

第一部分 历史背景

在这一部分的内容中，读者可以了解到一些最终导致人们认识到食品微生物的意义及其作用的早期所发生的事件。食品微生物学作为一个明确的学科分支目前无法准确了解它的起源。随着年代的久远，十分值得注意某些早期的发现和观察。所选择列出的有关食品保藏、食品腐败、食品中毒和食品立法的著名事件，可以作为食品微生物学演变及其发展的标注。

1. 食品微生物的历史

虽然很难确认人们意识到食品中存在着微生物及其作用的准确的时间，但是已有证据表明，这些知识起源于将细菌学和微生物学作为一门学科。将细菌学确定为一门学科以前的时代，可以称为近代科学出现以前的时代。这个时期也许可以进一步分成所谓的食品收集时期和食品产生时期。食品收集时期包括人类起源的10万多年前到8000多年以前，据推测，在这段时期中人类是食肉的，其后期是以植物作为食物，也正是在这个时期，首次开始食用熟的食物。

食品的产生起源于8000至10000年以前，直到现在。推测在这段时间的早期，出现了食品腐败和食物中毒问题。随着制作食物的出现，由于食物以及由于不适合的保存方法引起的食物迅速腐败所造成的疾病的传播问题也就出现了。很明显制作食品的起源大约是从公元前6000年开始。大约在公元前500年，陶器的制作从近东被带到西欧。近东第一个煮壶要追溯到大约公元前8000年以前。谷物的烹调、酿造和食品的保藏技艺就是从这一时期开始或者得到促进，并有了新的发展。最早酿造啤酒的证据可以追踪到古巴比伦时代，远在大约公元前7000年[8]。大约公元前3000年，苏美尔人被认为是最早进行规模化饲养家畜和制作乳品的人，并首先制出了黄油。众所周知的盐渍肉、鱼、脂肪、干制皮、小麦及大麦，也都与其文明有关。早在公元前3000年埃及人就食用牛奶、黄油和奶酪；公元前3000至1200年，犹太人用死海中获得的盐来保存各种食物；中国和希腊人的食物中就有盐腌鱼。据说是希腊人把这种方法传给了罗马人，罗马人的食物就包括盐腌肉。木乃伊的制作和食物的保存技术是相关的，并对其他生产发展起着影响。已经知道早在公元前3500年就有了葡萄酒的酿造。中国人和古巴比伦人早在公元前1500年就制作和消费发酵香肠[8]。

在这一时期出现的另一种保存食物的方法是使用橄榄油和芝麻油。Jensen[7]指出使用油会很大程度地导致葡萄球菌引起的食物中毒的发生。Seneca 指出，在大约 1000 多年以前，罗马人在保存除牛肉以外其它肉食方面的技术非常领先，并使用雪来包裹虾和其它易腐烂的东西。据推测，正如奶酪和葡萄酒的制作一样，熏肉的制作作为一种贮藏方式是在这一阶段出现的。值得怀疑的是，人们在这一时期是否就明白这些新发现的保存技术的本质，同样值得怀疑的是，是否认识到食物在传播疾病中的作用和食用感染后的动物肉所带来的危害。

在耶稣基督诞生和公元 1000 年期间，对食物中毒和食物腐败方面的认识几乎没有什么明显的进展。中世纪时，麦角中毒（由一种生长在黑麦和其他谷物中的真菌麦角菌引起）造成了许多人死亡，仅在公元 943 年法国由于麦角中毒就有造成 40000 多人死亡的记录，当时并不知道是这种症疾中毒是由一种真菌所引起。首次提到肉商是在 1156 年，1248 年瑞士人就涉及到了市场肉和非市场肉，1276 年在 Augsburg 颁布了一道屠宰和检查的强制性命令。虽然到 13 世纪人们意识到肉食的质量特性，但是毫无疑问还没有认识到肉的质量与微生物之间会产生必然的因果关系。修道士 A. Kircher 可能是第一个指出腐败食品中微生物的作用的人。早在 1658 年，A. Kircher 在研究腐烂的尸体、腐败的肉和牛奶以及其它物质时发现了当时他称之为“虫”的物体。然而，由于 A. Kircher 的描述不够严谨，他的观察结果并没有被广泛地接受。L. Spallanzani 于 1765 年指出：将煮沸的牛肉汤放置 1h 后就会腐败，而煮沸后封闭保存的牛肉汤则不会变质。L. Spallanzani 用他的实验反驳了生命会自然产生的学说。但是，当时他并不能使他的支持者确信他的理论，因为他们认为 L. Spallanzani 的实验结果是由于煮沸赶走了对生命自发产生至关重要的 O_2 所导致。1837 年 Schwann 将经过加热管的空气通入加热过的浸液中后，仍然可以保持浸液的无菌状态。虽然 A. Kircher 和 L. Spallanzani 提出了通过加热可以保存食物的观点，但是他们都没有把其发现进行相关的应用研究。D. Papin 和 G. Leibniz 在 18 世纪也提出过类似加热可以保存食物的观点。

真正的罐藏是始于 1795 年，当时法国政府为找到实用的食物保存方法，提供了 1.2 万法郎的奖金进行悬赏。1809 年，巴黎的糖果制造商 Francoins（Nicolas）Appert 使用玻璃瓶成功地保存了肉类物质，就是把玻璃瓶放入煮沸的水中保持不同的时间。这一发现于 1810 年公诸于世，Appert 为此也获得了专利。由于 Appert 不是专门进行研究的科学家，因此没有意识到自己的发现所具有的深远意义，也不知道其中的原因。当然，众所周知，这就是现在使用的罐藏方法的开始。这一发现是要比 L. Pasteur 阐明法国葡萄酒酸败是由于微生物作用的结果要早 50 年。L. Pasteur 的发现又重新发现了细菌。早在 1683 年荷兰人 A. Leeuwenhoek 通过显微镜已经观察到了细菌，并且对细菌进行了描述。但是，Appert 是不可能认识到这一点，因为 Appert 并不是科学家。即使是在法国也没有出现 A. Leeuwenhoek 那样的观察报告。

第一个意识并发现食品中微生物的存在及其作用的人是 L. Pasteur。他在 1837 年指出：牛奶变酸是由微生物所造成的。大约在 1860 年 L. Pasteur 首先用加热的方法杀灭了葡萄酒和啤酒中令人讨厌的微生物，这一过程就是目前所说的 Pasteur 灭菌法。

1.1 发展的历史

有关食品的保存、食品的腐败、食品中毒和食品立法过程中具有重要意义的事件及发生的时间如下：

1.1.1 食品保存

1782 年——瑞典化学家开始使用罐藏的醋。

1810 年——在法国 Appert 的罐藏食品技术获得专利。

——Peter Durand 获得英国专利，该技术是“使用玻璃、陶器、锡或其它金属材料、合适的材料保存食物”；Hall、Gamble 和 Donkin 从 Appert 处获得此专利[1,4]；参见参考文献 1 和 4。

1813 年——Donkin、Hall 和 Gamble 对罐藏食品采用后续工艺保温技术。

——认为使用 SO_2 作为肉的防腐剂是从这个时候开始。

1825 年——T. Kensett 和 E. Daggett 的马口铁罐藏食品技术获得美国专利。

1835 年——英国的 Newton 获得浓缩乳技术的专利。

1837 年——Winslow 首先将玉米制成罐头。

1839 年——美国广泛使用罐头。

——L. A. Fastier 由于使用盐水浴提高了水的沸点。

1840 年——首次将鱼和水果制成罐头。

1841 年——S. Goldner 和 J. Wertheimer 的基于 Fastier 方法的盐水浴获得英国专利。

1842 年——英国的 H. Benjamin 获得使用冰和盐水浸入法冷冻食品的专利。

1843 年——I. Winslow 首次使用蒸汽杀菌。

1845 年——S. Elliott 将罐藏技术传播到澳大利亚。

1853 年——R. Chevallier-Appert 因食品的高压灭菌获得专利。

1854 年——Pasteur 研究葡萄酒的难题，在 1867～1868 年间采用加热去除不良微生物的方法进入工业化实践。

1855 年——英国的 Grimwade 首次生产乳粉。

1856 年——美国的 Gail Borden 获得制造不加糖炼乳的专利。

1861 年——I. Solomon 在美国使用盐水浴方法。

1865 年——商业规模的人工冷冻鱼在美国出现，随后于 1889 年人工冷冻鸡蛋出现。

1874 年——在海上运输肉过程中首次广泛使用冰。

——使用蒸汽压力锅。

1878 年——首次成功地从澳大利亚向英国船运冷冻肉；1882 年首次成功地完成从新西兰向英国运送冷冻肉。

1880 年——在德国开始对乳进行巴斯德杀菌。

1882 年——Krukowisch 首次提出臭氧对腐败细菌具有毁灭性作用。

1886 年——美国的 A. F. Spawn 采用机械化干燥水果和蔬菜。
1890 年——在美国对牛乳采用工业化巴斯德杀菌工艺。
——水果贮藏的机械化冷藏在芝加哥诞生。
1893 年——H. L. Coit 在新泽西州发起合格牛乳运动。
1895 年——Russell 首次对罐藏食品进行细菌学研究。
1907 年——E. Metchnikoff 以及合作者分离并命名酸奶细菌保加利亚乳杆菌。
——B. T. P. Barker 提出苹果酒生产中醋酸菌的作用。
1908 年——美国官方批准苯甲酸钠作为某些食品的防腐剂。
1916 年——德国的 R. Plank，E. Ehrenbaum 和 K. Reuter 实现了食品的速冻。
1917 年——美国的 Clarence Birdseye 开始从事冷冻食品的零售业务。
——Franks 采用 CO_2 保存水果和蔬菜技术获得专利。
1920 年　Bigelow 和 Esty 发表了关于芽孢在 100℃下的耐热性的系统研究，Bigelow，Bohart，Richardson 和 Ball 提出计算热处理的“一般方法”，1923 年 C. O. Ball 简化了这个方法。
1922 年——Esty 和 Meyer 提出肉毒梭状芽孢杆菌的芽孢在磷酸缓冲溶液中的 Z 值为 18F。
1928 年——在欧洲首次采用气调方法贮藏苹果（首次在纽约是在 1940 年）。
1929 年　使用高能辐射处理食品的专利在法国签署。
——Birdseye 的冷冻食品出现在零售市场。
1943 年——美国的 B. E. Proctor 首次采用离子辐射保存汉堡肉。
1950 年——D 值概念进入使用。
1954 年——用抗菌的乳链球菌肽在奶酪加工中控制梭状芽孢菌腐败的技术在英国获得专利。
1955 年——山梨酸通过批准作为食品防腐剂。
——抗生素金霉素获得批准在新鲜家禽中使用〔羟四环素（土霉素）在一年后得到批准〕，1966 年该批准被撤消。
1967 年——第一台工业化辐射食品设备进行设计构思，并在美国完成设计。第二台于 1992 年在美国佛罗里达州开始使用。
1988 年——在美国乳酸链球菌肽被列为“一般公认安全”(GRAS)。
1990 年——在美国对海鲜食品强制性实施 HACCP 体系（详见第六部分 19）。

1.1.2 食品腐败

1659 年——Kircher 证实了牛乳中含有细菌；Bonderu 在 1847 年得到同样的结论。
1680 年——Leeuwenhoek 首先发现了酵母细胞。
1780 年——Scheele 发现酸奶中主要的酸是乳酸。
1836 年——Latour 发现了酵母的存在。
1839 年　Kircher 研究发黏的甜菜汁并发现了可在蔗糖溶液中生长并使其发黏的微生物。

1857 年——Pasteur 揭示出牛乳的发酸是由于微生物在其中生长的结果。

1866 年——L. Pasteur 的著作“*Etude sur le Vin*”出版。

1867 年——Martin 发展了奶酪变酸与酒精、乳酸和丁酸发酵相似的理论。

1873 年——Gayon 首次发表关于鸡蛋的微生物变质的研究。

——Lister 第一个在纯培养中分离出乳酸乳球菌。

1876 年　Tyndall 发现腐败物质中的细菌总是可以从空气、物质或容器中检测到。

1878 年　Cienkowski 报道首次对糖的黏液进行微生物学研究，并从中分离出肠膜明串珠菌。

1887 年　Foster 首先提出纯培养的细菌可以在 0℃条件下生长。

1888 年——Miquel 首先研究嗜热细菌。

1895 年——荷兰阿姆斯特丹的 Von Geuns 首先进行了牛乳中细菌的计数工作。

——S. C. Prescott 和 W. Underwood 首次跟踪研究不良热处理罐藏玉米的腐败。

1902 年——“嗜冷菌”这一概念被 Schmidt-Nielsen 用在处于 0℃条件下生长的微生物。

1912 年——“嗜高渗微生物”被 Richter 用来描述处于高渗透压环境中的酵母。

1915 年——B. W. Hammer 首次从凝结的牛乳中分离出凝结芽孢杆菌。

1917 年——P. J. Donk 首次从奶油状的玉米中分离出嗜热脂肪芽孢杆菌。

1933 年——英国的 Oliver 和 Smith 观察 Byssochlamys fulva 的腐败，第一次在美国的研究是由 D. Maunder 于 1964 年进行的。

1.1.3 食物中毒

1820 年——德国诗人 Justinus Kerner 描述了“香肠中毒”（可能是肉毒中毒）及其致死率。

1857 年——在英国 Penrith，W. Taylor 指控牛乳是伤寒热传播媒介。

1870 年——Francesco Selmi 发展了尸毒理论，指出由于食入某些食品所导致的疾病。

1888 年——Gaertner 首先从导致 57 人食物中毒的肉食中分离出肠炎沙门氏菌。

1894 年——T. Denys 首次将葡萄球菌与食物中毒联系起来。

1896 年——Van Remengem 首先发现了肉毒梭状芽孢杆菌。

1904 年——G. Landman 分离并鉴定出 A 型肉毒梭状芽孢杆菌。

1906 年——确认了蜡状芽孢杆菌食物中毒，首例裂头绦虫病真相（diphyllobothriasis）被确认。

1926 年——Linden，Turner 和 Thom 提出了首例链球菌引起的食物中毒。

1937 年——L. Bier 和 E. Hazen 鉴定出 E 型肉毒梭状芽孢杆菌。

1937 年——确认出贝类麻痹中毒。

1938 年——寻找到弯曲菌肠炎爆发的原因是牛乳。

1939 年——Schleifstein 和 Coleman 确定了小肠结肠炎耶尔森氏菌引起的胃肠炎。

1945 年——McClung 首次证实食物中毒中产气荚膜梭状芽孢杆菌的病原机理。
1951 年——日本的 T. Fujino 提出副溶血弧菌是引起食物中毒的原因。
1955 年——S. Thompson 指出婴儿霍乱和大肠杆菌胃肠炎之间的相似性。
——鲭鱼中毒被确认。
——首例有记载的异尖线虫病（anisakiasis）发生在美国。
1960 年——Moller 和 Scheibel 鉴定出 F 型肉毒梭状芽孢杆菌。
——首次报道黄曲霉产生黄曲霉毒素。
1965 年——确认了由食物传播的贾第鞭毛虫病（giardiasis）。
1969 年——气荚膜梭状芽孢杆菌的肠毒素被 C. L. Duncan 和 D. H. Strong 确定。
——G 型肉毒梭状芽孢杆菌在阿根廷由 Gimenez 和 Ciccarelli 首次分离出来。
1971 年——在美国的马里兰州首次暴发食品传播的副溶血弧菌引起的胃肠炎。
——出现食物传播的大肠杆菌胃肠炎在美国第一次暴发的记载。
1975 年——L. R. Koupal 和 R. H. Deibel 证实沙门氏菌肠毒素。
1976 年——在美国纽约首次暴发食物传播小肠结肠炎耶尔森氏菌引起的胃肠炎。
——在美国加利福尼亚发生婴儿肉毒中毒。
1978 年——澳大利亚首次出现 Norwalk 病毒引起的食物传播的胃肠炎的记载。
1979 年——美国佛罗里达州发生了非 01 的霍乱弧菌引发的食物传播的胃肠炎；在此之前在捷克斯洛伐克（1965）和澳大利亚（1973）就曾经暴发过这类胃肠炎。
1981 年——在美国暴发了食物传播的李斯特病。
1982 年——在美国首次暴发了由食物产生血性结肠炎。
1983 年——Ruiz-Palacios 等描述了空肠弯曲杆菌肠毒素。

1.1.4 食品立法

1890 年——通过了第一部关于肉检验的国家法令，但只要求检验出口的肉制品。
1895 年——修改了前面这部肉检验的法令，加强了某些条款。
1906 年——美国国会通过了美国食品与药物条例。
1910 年——纽约市健康委员会签署了要求对牛奶进行巴斯德杀菌的命令。
1939 年——新的食品、药物和化妆品条例成为法规。
1954 年——美国国会通过了对食品、药物和化妆品法规中杀虫剂方面的修订。
1957 年——美国执行强制性家禽及家禽制品法规。
1958 年——美国通过了食品、药物和化妆品有关食品添加剂的条例。
1962 年——美国 Talmadge-Aiken 条例（国家对各联邦的肉食进行检测）形成法规。
1963 年——美国食品与药物管理局通过使用辐射处理来贮藏培根。
1967 年——美国国会通过安全肉条例，并于 12 月 5 日成为法规。
1968 年——美国食品与药物管理局撤消了 1963 年通过的辐射保藏培根的条例。
——将家禽检测议案签署成为法规。

1969 年——美国食品与药物管理局规定允许食用的谷物和坚果存有 0.2mg/kg 的黄曲霉毒素。

1973 年——美国俄勒冈州对新鲜和加工的零售肉执行微生物标准，1977 年又废除了该标准。

参 考 文 献

[1] Bishop, P. W. 1978. Who introduced the tin can? Nicolas Appert? Peter Durand? Bryan Donkin? *Food Technol.* 32 (4): 60～67.

[2] Brandly, P. J., G. Migaki, and K. E. Taylor. 1966. *Meat Hygiene*, 3d ed., ch. 1. Philadelphia: lea & Febiger.

[3] Cowell, N. D. 1995. Who introduced the tin can? --A new candidate. *Food Technol.* 49 (12): 61～64.

[4] Farrer, K. T. H. 1979. Who invented the brine bath? - The Isaac Solomon myth. *Food Technol.* 33 (2): 75～77.

[5] Goldblith, S. A. 1971. A condensed history of the science and technology of thermal processing. *Food Technol.* 25 (12): 41～50.

[6] Goldblith, S. A., M. A. Joslyn, and J. T. R. Nickerson. 1961. *Introduction to Thermal Processing of Foods*, vol. 1. Westport, CT: AVI.

[7] Jensen, L. B. 1953. *Man's Foods*, chs. 1, 4, 12. Champaign, IL: Garrard Press.

[8] Pederson, C. S. 1971. *Microbiology of Food Fermentations*. Westport, CT: AVI.

[9] Schormüller, J. 1966. *Die Erhaltung der Lebensmittel*. Stuttgart: Ferdinand Enke Verlag.

[10] Stewart, G. F., and M. A. Amerine. 1973. *Introduction to Food Science and Technology*, ch. 1. New York: Academic Press.

[11] Tanner, F. W. 1944. *The Microbiology of Foods*, 2d ed. Champaign, IL: Garrard Press.

[12] Tanner, F. W., and L. P. Tanner. 1953. *Food-borne Infections and Intoxications*, 2d ed. Champaign, IL: Garrard Press.

第二部分　分布、分类和生长参数

在过去的十年中，食品微生物的分类有了许多变化。这些变化与食品微生物的主要分布包括在第二章的内容中。而影响微生物生长的参数将安排在第三部分中。详细情况可以参考下列资料：

Deak，T. 和 L. R. Beuchat. 1996 年编著的《食品腐败酵母手册》(Boca Raton，Fla.：CRC Press，Inc.)。主要内容：食品腐败酵母的检测，计数和鉴定。

食品微生物分类国际委员会（ICMSF）1980 年编著的《食品微生物生态学》（第一卷）(New York：Academic Press)。主要内容：介绍影响食品微生物生长的内在和外部因素。

T. J. Montville. 1987 编著的《食品微生物学》（第一卷）(Boca Raton，Fl.：CRC Press.)。主要内容：介绍微生物生长所有的内在因素。

A. H. Rose. 1987 编著的《酵母生物学》(New York：Academic Press) 主要内容：论述酵母生物学和分类学。

2. 食品微生物的分类、作用和重要性

由于人类的食物大多来源于植物和动物，因此，了解与动、植物生长环境和作用相关的微生物群落的生态学原理是十分重要的。虽然有时微生物通过侵染和毁坏动、植物来破坏我们的食品资源，但这决不是自然界中主要的作用。在这个星球上，按照我们现在的观点，自然界中微生物的主要功能是自我生存。在此过程中异养菌进行的反应如下：

当然其中最重要的是氮循环和其它元素的循环（图 2.1）。微生物腐败食物可以简单地看成是食品微生物执行其自然界中主要功能的过程，不应该将它理解为是其自身的目的（目的论）。与高等生物相比，尽管微生物比较简单，但是微生物却能够进行对其生存极为重要的许多复杂的化学反应。为此，微生物必须从有机物中获取营养，而某些有机物是我们的食物的构成。

如果人们研究与自然界中动植物食品相关的微生物的类型，那么就可以预测到在之后的食品中可能会存在的微生物的一般的类型。许多研究表明未处理的食物可能存在大量的细菌、霉菌、酵母，加工的食品中微生物数量所带来的食品的安全性的问题就出现了。问题应该是双重的：每克或毫升中微生物的总量？在这些微生物总量中那些微生物

是有代表性？必须知道哪些微生物与自然状态的特殊食品有关，哪些现存的微生物对特殊食品不是通常应该存在的。因此，了解细菌在自然界中一般的分布情况以及了解在食物生长或食品加工特殊条件下通常存在的微生物的一般类型是很有价值。

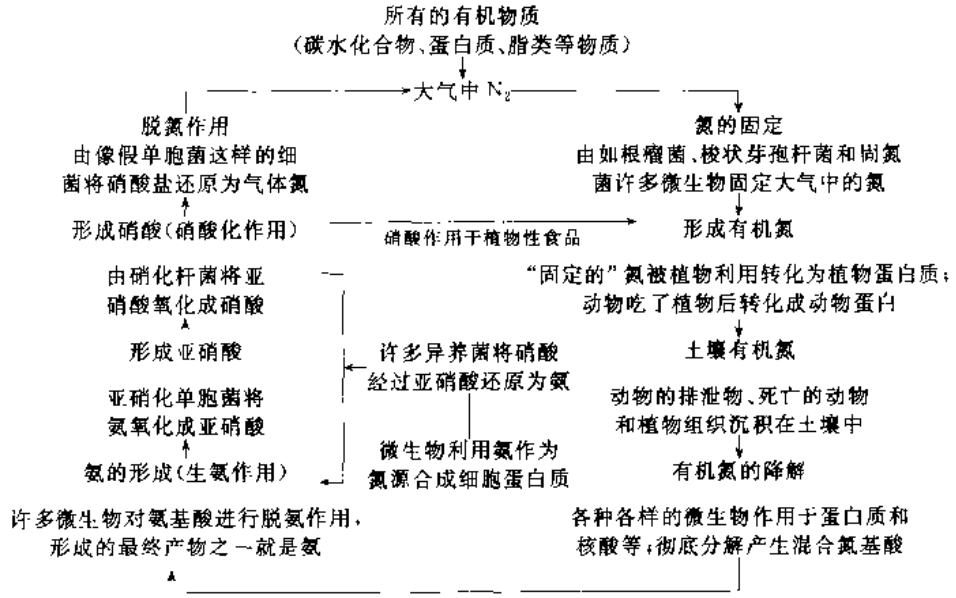


图 2.1 自然界中氮循环以及微生物作用的图解

（摘自 M. J. Pelczar 和 R. Reid 编著的《微生物学》（McGraw-Hill Book Company，1965）

2.1 细菌的分类

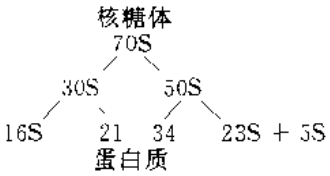
细菌的分类在过去十年中有许多变化。并且由于采用了分子遗传学的方法或分子遗传学与传统的方法相结合的方法，而产生了许多新的分类群。

- DNA 同源性和 DNA 中（G+C）的摩尔分数
- 23S，16S 和 5S rRNA 序列的类似性
- 寡核苷酸种类
- 全可溶性蛋白或一系列形态与生化特征的数值分类法
- 细胞壁分析
- 血清反应法
- 细胞脂肪酸组成

虽然这些方法中有些方法（例如：细胞壁分析和血清反应）已经使用了许多年，还有一些方法（例如：rRNA 序列的相似性）在 20 世纪 80 年代就已经广泛地得到了应用。下面将略述和探讨作为细菌分类中最权威的方法。

2.1.1 rRNA 序列的分析

从核苷酸序列的 RNA 以及检测 RNA 序列的相似性中能够得到分类的信息。首先，原核生物的核糖体是 70S (Svedberg)，它是由二个单独功能的亚基 50S 和 30S 组成。50S 亚基则由 23S、5S RNA 和 34 种蛋白质组成，而 30S 是由 16S RNA 和 21 蛋白质组成。



16S RNA 的保真性极高，它是细菌很好的计时器[44]。使用反转录酶对 16S rRNA 进行测序，测序的长度可达整个序列的 95%，这样可以精确地检测出微生物的亲缘关系[25]。由于 5S RNA 的尺寸较短，因此可以对其进行完全测序。

为了对 16S rRNA 进行测序，以 RNA 作为模版用反转录酶来合成出一条单链 DNA 的拷贝。在双脱氧核苷酸存在条件下合成单链 DNA，各种大小不同的 DNA 片段可以使用 Sanger 方法进行测序。按照这个 DNA 的序列可以推断出 16S rRNA 的序列。正是通过对 16S rRNA 序列的研究，使得 Woese 以及他的助手提出并创立了生命形式的三个王国：真核、古细菌和原核生物。食品中重要的细菌是真细菌，原核生物也包括蓝藻细菌和真细菌。由于广泛地使用 16S rRNA 序列相似法，新的食品传播的微生物分类群就是通过这种分类方法与其他的信息相结合而创立出来。虽然已经建立起了真细菌的 5S rRNA 序列库，但是 16S RNA 的序列信息还比较少。

对许多微生物已经建立了 16S rRNA 核苷酸目录，也有了 16S rRNA 核苷酸序列库。这个方法，采用 RNAseT1 酶将 16S rRNA 进行降解，RNAseT1 酶是在 G 残基上分解 RNA 分子，因此对 6-20 碱基片段进行分离、测序，再比较微生物之间 S_{AB}的相似性。尽管 S_{AB}的关系以及同源的百分数低于 0.4 就不好了，但是对于确定到门也还是十分有用的。用反转录酶确定 16S rRNA 的序列要比确定寡核苷酸目录更好，因为它可以定出更长的 rRNA 序列。

2.1.2 DNA 的分析

采用 DNA 中（G+C）的摩尔分数的方法来分类细菌已经有几十年的历史，与 16SrRNA 和 5SrRNA 序列的测定相结合使这个方法更加有意义。使用 16SrRNA 的分析法可以将革兰氏阳性的真细菌分为二个门：一组是 G+C 的摩尔分数大于 55%；另一组是小于 50%[44]。前面这一组包括链球菌、丙酸杆菌、微球菌、双歧杆菌、棒杆菌、短杆菌等等；另外（G+C）的摩尔分数低的一组包括梭状芽孢杆菌、芽孢杆菌、葡萄球菌、乳杆菌、片球菌、明串珠菌、李斯特菌、丹毒丝菌等等，这一组称为真细菌树中的梭状芽孢杆菌分枝。如果二个微生物的（G+C）含量相差 10%，那么它们的碱基序列相同的就很少。

DNA-DNA 或 DNA-RNA 的杂交法也已经使用了有段时间了，在细菌的分类学中它一直是很有用的方法。已经表明细菌分类理想的参照系统是某个微生物完整的 DNA 序列[42]。人们普遍认为使用 DNA-DNA 杂交的结果可以确定细菌的种名，而 70%或 70%以上的相关性以及 5℃或<5℃的 T_m 就可以确定种[42]。使用 DNA-DNA 杂交法时，表型的特征无法避免会存在例外的情况[42]。尽管比较难以确定属，但是只要序列上最低需要有 20%的相似性就可以认为是 DNA DNA 同源。

即使对细菌属还没有一个满意的系统分类的定义，持续应用核酸技术，并结合以上

提及的其它方法，最终可以形成一个细菌的亲缘分类体系。同时，现有分类群也会不断地改进。

食品中一些重要的已知微生物属依字母的顺序列在下面，其中有的微生物在有些食品中是有益的，有的则会造成腐败或引起胃肠炎：

细菌

不动杆菌	欧文氏菌	片球菌
气单胞菌	埃希氏菌	变形菌
产碱菌	黄杆菌	假单胞菌
芽孢杆菌	哈夫尼菌	嗜冷杆菌
索丝菌	考克氏菌	沙门氏菌
弯曲杆菌	乳球菌	沙雷氏菌
肉杆菌	乳杆菌	希瓦氏菌
柠檬素杆菌	明串珠菌	志贺氏菌
棒杆菌	李斯特菌	葡萄球菌
梭状芽孢杆菌	微球菌	漫游球菌
肠杆菌	莫拉氏菌	弧菌
肠球菌	类芽孢杆菌	魏斯氏菌
	泛菌	耶尔森氏菌

霉菌

链格孢	枝孢霉	毛霉
曲霉	刺盘孢霉	青霉
短柄霉	尖镰孢	根霉
葡萄孢	白地霉	木霉
丝衣霉	丛根孢	*Wallemia*
		Xeromyces

酵母

酒香酵母	伊氏酵母	裂殖酵母
假丝酵母	克鲁维酵母	有孢酵母
隐球酵母	毕赤酵母	丝孢酵母
德巴里酵母	红酵母	接合酵母
有孢汉逊酵母	酵母属	

原生动物

Crytosporidium parvum	贾第虫
痢疾内变形虫	鼠弓形虫

2.2 食品中微生物的主要来源

前面列出的微生物的种属通常都是食品中发现的重要的食品微生物。每一个属的微生物都有其特殊的营养要求，并且每个属都以该属固定特有的方式受到环境因素的影响。食品微生物的八个环境源见下述，表 2.1 列出这些微生物的环境源以及其中存在的细菌和原生动物。

表 2.1　　食品中相对重要的细菌和原生动物的八个来源

微　生　物	土壤和水	植物和植物产品	食品器皿、用具	人与动物的肠道	食品生产者	动物饲料	畜皮	空气和尘埃
细菌								
不动杆菌	××	×	×				×	×
气单胞菌	××[a]	×						
产碱菌	×	×	×	×			×	××
交替单胞菌	××[a]							
芽孢杆菌	××[c]	×	×		×	×	×	××
索丝菌		××	×					
弯曲杆菌				××	×			
肉杆菌	×	×	×					
柠檬素杆菌	×	××	×	××				
梭状芽孢杆菌	××[b]	×	×	×	×	×	×	××
棒杆菌	××[b]	×	×		×		×	×
肠杆菌	×	××	×				×	
肠球菌	×	×	×	××	×	×	×	×
欧文氏菌	×	××	×					
埃希氏菌	×	×		××	×			
黄杆菌	×	××					×	
哈夫尼菌	×	×		××			×	
考克氏菌	×	×	×		×		×	×
乳球菌		××	×	×			×	
乳杆菌		××	×	×			×	
明串珠菌		××	×	×			×	
李斯特菌	×	××		×	×	×	×	
微球菌	×	×	×		×	×	×	××
莫拉氏菌	×	×					×	
类芽孢杆菌	××	×	×					××
泛菌	×	×		×				
片球菌		××	×	×				
变形菌	×	×	×	×	×		×	
假单胞菌	××	×	×				×	
嗜冷杆菌	××	×	×				×	
沙门氏菌				××		××		
沙雷氏菌	×	×	×	×		×	×	
希瓦氏菌	×	×						
志贺氏菌				××				
葡萄球菌				×	××			×
漫游球菌	××			×				
弧菌	××[a]			×				
魏斯氏菌		××	×					
耶尔森氏菌	×	×		×				
原生动物								
C. parvum	××[a]			×	×			
痢疾内变形虫	××[a]			×	×			

续表

微 生 物	土壤和水	植物和植物产品	食品器皿、用具	人与动物的肠道	食品生产者	动物饲料	畜皮	空气和尘埃
贾第虫	××[a]			×	×			
鼠弓形虫		×		××				

注：××表示为非常重要的来源。

[a] 主要为水中来源。

[b] 主要为土壤来源。

2.2.1 土壤和水

将这两个环境放在一起是因为许多栖息在一起的细菌和霉菌有许多共同之处。由于风的作用，土壤微生物会进入空气中，下雨时再进入水体中。当雨水流入土壤时，土壤微生物也会进入水体中。水中的微生物可通过云的形成接着下雨落下来再进入土壤中。这样往复的循环使得水和土壤中的微生物在很大程度上是相同的。但是有些水中微生物在土壤中无法存留，尤其是这些水生海洋微生物。交替单胞菌是需要在海水中生长的水生微生物，它在土壤中无法存留下来。海水中的微生物群主要是革兰氏阴性菌，其中存在的革兰氏阳性菌也只是暂居微生物。

2.2.2 植物和植物产品

可以假定许多或大多数水和土壤微生物都会沾染到植物上。但是只有很少的微生物适合在植物环境中存在。能存留在植物产品中的微生物之所以能够在植物上生存，正是由于它们具有能够附着在植物表面、不易被洗去的特点，能够获得其所需的营养。其他通常与植物相关的就是棒杆菌、短小杆菌、假单胞菌、黄单胞菌等属的植物细菌病原菌以及几个霉菌属的植物真菌病原菌。

2.2.3 食品器皿、用具

将蔬菜收放在容器或用具中，就会发现蔬菜表面的某些或所有微生物可污染其接触的用具。当同一个容器中放入的蔬菜越来越多时，就会产生一定数量的微生物菌落。同样，在肉类市场上切割肉块时，切割的刀具和绞碎机上就污染了肉上的微生物，这个过程就组成了微生物群落，形成了相当稳定数量的肉制品传播的微生物。

2.2.4 人与动物的肠道

当使用污染的水冲洗食品原料时，肠道微生物就变成水源微生物。肠道微生物菌群是由许多不能在水中长期存留的微生物，很明显的是如沙门氏菌那样的病原菌。所有的肠道菌都可以在粪便中找到，粪便中同时还有包括四种原生动物的肠道病原菌。

2.2.5 食品生产者

食品生产者的手上以及外套上的微生物能够反映出微生物的环境和栖息特性，这些微生物是来自土壤、水、尘埃和其他环境之中。另外一个微生物的重要的来源就是生产

者的鼻孔、口腔和皮肤，肠道微生物可以通过不卫生的操作进入食品中去。

2.2.6 动物饲料

动物饲料一直是家禽和其他动物沙门氏菌的重要来源。已经了解某些青贮饲料是乳品和肉禽单核细胞增生李斯特菌主要的来源。干饲料中的微生物可以通过动物的生长环境扩散开来，存留在动物的皮毛上。

2.2.7 畜皮

例如对于乳牛，在没有按照正确的产乳程序的操作中，鲜乳中的微生物的类型反映出奶牛乳房上的微生物以及动物生存环境中的微生物的群落。通过动物的毛皮和乳房，微生物能够污染环境、鲜乳和生产者的手。

2.2.8 空气和尘埃

虽然列在表 2.1 中的大多数的微生物有时能够在食品加工的空气和尘埃中找到，但是可以存留下来的微生物包括列出的革兰氏阳性菌。在空气和尘埃中还有许多霉菌和一些酵母。一般来讲，空气和尘埃中的微生物的类型是可以经常存在于环境中的微生物，尘埃是微生物主要的来源。

2.3 食品中常见的细菌概要

本概要将全书所涉及的细菌简要地介绍给读者，这些微生物并不是用于菌种的鉴定。对于菌种的鉴定详见参考资料。

气单胞菌 (ae. ro. mo'nas；产气)：典型的水生革兰氏阴性棒状杆状菌。曾归入弧菌科，现归入气单胞菌科。如其属名，该属菌株能发酵糖类并产生大量气体。它们通常出现在鱼以及鱼类病原体中。其 DNA 中 (G+C) 的摩尔分数为 57%～65%。

产碱菌 (al. ca. li'ge. nes；产碱)：属革兰氏阴性棒状杆状菌，但菌体着色时有时也显现革兰氏阳性反应。正如属名所述，不能发酵糖类，但能够产碱 (特别是在石蕊乳中)。该属菌株不产色素，分布在自然界中各种腐烂物质中，并大量存在于原乳、食用家禽制品以及排泄物中。其 DNA 中 (G+C) (摩尔分数) 为 58%～70%，这也表明该属菌株种类比较丰富。

Alteromonas (al. te. ro. mo'nas：单细胞微生物)：均为革兰氏阴性杆菌，能运动，好氧菌。大量存在于海洋中或沿海水域中，海洋食品中也能发现该属菌株。该属菌株需要依靠海水中盐分生长。

芽孢杆菌 (ba. cal'lus)：革兰氏阳性杆菌，产孢子，与厌氧菌梭状芽孢杆菌相反，为好氧菌。大部分为中温微生物，但也有部分嗜寒微生物、嗜热微生物。包括两种病原体：炭疽芽孢杆菌 (引发炭疽热) 和蜡状芽孢杆菌。尽管其它种微生物都是非病原体，但有些菌株会引起由食品中毒而引起的胃肠炎 (我们将在第七部分 21 中讨论)。根据现代分类学中的种属亲源关系的判别依据 —— 微小的亚单位 rRNA 序列数据，认为该属微生物

由 5 组构成[2]。第一组包括蜡状芽孢杆菌，枯草芽孢杆菌，凝结芽孢杆菌和炭疽芽孢杆菌等，这组微生物看起来极有可能保留在芽孢杆菌属中。第 3 组菌株现在已经有了新的属名类芽孢杆菌（见下页），而嗜热脂肪芽孢杆菌则归入了第 5 组。嗜酸的芽孢杆菌属菌株酸热芽孢杆菌、酸土芽孢杆菌和环庚基芽孢杆菌现在重新划分归入了新的脂环酸芽孢杆菌属[43]。后者的 DNA 中（G+C）摩尔分数为 51.6%～60.3%，能够在 35～70℃之间生长，其生长 pH 范围为（G+C）2～6。

索丝菌（bro. cho. thr′ix；*Gr. brochs*，*loop*；*thrix*，*thread*）：革兰氏阳性杆菌，不产孢子。与乳杆菌属和李斯特氏菌属[31]种属亲源关系密切。其特征性状将在第七部分 22 中进行讨论。尽管它们不是真正意义上棒状杆菌，但它们具有许多杆菌的类似之处。对数期的细胞为棒杆状，是典型的棒状杆菌，而老熟后则为球菌。尽管该属只有两株菌株，热杀索丝菌和乡间索丝菌，但分类学 rRNA 数据再次证实该属划分的准确性。它们具有微杆菌属的特征性状，通常存在于肉类以及冷藏温度下保存的新鲜的真空包装的肉类制品中。与热杀索丝菌相比，乡间索丝菌能够利用鼠李糖和马尿酸盐[44]，其 DNA 中（G+C）摩尔分数为 36%。

弯曲杆菌（cam. py′. lo. bac. ter；*Gr. campylo*，曲形）：虽然大多数人发音为“camp′lo. bac. ter”，但在学术上的正确发音应当见注释。这些革兰氏阴性菌，弯曲成螺旋状杆菌，曾归入弧菌类，厌氧或需要极少氧。该属在 1984 年被重新划分。其中硝化弯曲菌和嗜低温弯曲菌组成了新的弓形菌属属；而同性恋弯曲菌和菲氏弯曲菌也被归入了螺杆菌属；屈曲沃林氏菌和直肠沃林氏菌就是现在的屈曲弯曲杆菌和直肠弯曲杆菌[37]。其 DNA 中（G+C）的摩尔分数为 30%～35%。其余详细情况见参考书[30]或本书第七部分 25。

肉杆菌（car. no. bac. terium；*L. carnis*，新鲜肉类上的细菌）：革兰氏阳性杆菌，过氧化氢酶阴性，曾归入乳酸杆菌属。其种属亲源关系与肠道球菌和漫游球菌更为相似。异型发酵，绝大多数能在 0～45℃之间生长。有些种能够发酵葡萄糖产生气体。该属菌株 DNA 中（G+C）的摩尔分数为 33.0%～37.2%。它们与乳酸杆菌的区别在于不能在醋酸盐培养基上生长，在代谢过程中能够合成油酸。通常存在于真空包装的肉制品或相关制品如鱼或者家禽制品中[10,19,46]。

柠檬素杆菌（cit. ro. bac′ter）：这些肠道细菌进行缓慢的乳糖发酵，革兰氏阴性杆菌。所有菌株都能够利用柠檬酸盐为惟一碳源生长。弗氏柠檬酸细菌是其中与食品关系最密切的菌株，它与其他菌株不同，通常存在于蔬菜或新鲜的肉类上。其 DNA 中（G+C）的摩尔分数为 50%～52%。

梭杆菌（clos. tri′di. um；*Gr. closter.*）：厌氧杆菌，产孢子。广泛分布于自然界中，与好氧微生物芽孢杆菌类似。该属包括许多菌株，有些会引起人体疾病（见第七部分 21 产气荚膜梭菌食品中毒与香肠中毒）。中间营养型，嗜冷型，嗜热型菌株都存在。它们的重要之处将在第五部分 16 热的罐头食品中讨论。这个被重新划分的属包括以下几个 5 个新属：C. aloramater，产线菌属，穆尔氏菌属，产醋杆菌属，嗜草酸菌属[6]。梭菌属的菌株在食品行业中以在大量存在于食品中著称。但这 5 个重新划分的属对食品工业来说并不十分重要。

梭状芽孢杆菌（co. ry. ne. bac. ter′um；*Gr.*，*coryne*，*club*）：该属菌株是真正的棒状

杆菌，革兰氏阳性，棒杆状。与部分蔬菜以及肉类制品的腐败有关。尽管以嗜冷菌株而著称，但大多数菌株都是中间营养型。其中白喉棒杆菌能够引起人体白喉病。由于棍状杆菌属和短小杆菌属归入植物病原体，该属菌株数因而减少。其 DNA 中（G+C）摩尔分数为 51%～63%。

肠杆菌（en. te. ro. bac'ter）：尽管总的来说这些肠道革兰氏阴性菌并不适应胃肠管道，但它们是典型的人体生长所需要的肠道菌。我们将在第 18 章中讨论成团肠杆菌的特征。

肠球菌（en. te. ro. coc'cus）：该属的建立与血清学中的 D 型球菌有关。菌体呈卵形单个、成对或短链状出现。现该属菌株已超过 16 个。以前曾将它们归入链杆菌属。该属至少有三株菌株不与 D 型抗血清发生反应。我们将在第六部分 18 中对该属进行详细的阐述。该属菌株与其他乳酸菌属的亲源关系见图 22.1。

欧文氏菌（er. wi'ni. a）：这些革兰氏阴性肠道杆菌与植物的关系密切，它们能引起细菌性腐败，但不产酒精（见第三部分 8）。该属至少有 3 株菌株已经归入泛菌属，其 DNA 中（G－C）的摩尔分数为 51%～63%。

埃希氏菌（esch. er. i'chi. a）：该属是目前细菌中研究最为广泛的属。这些菌株能够引起由食物传染的肠胃炎，我们将在第七部分 24 及第六部分 18（主要讨论以大肠杆菌作为食品安全性指标）中进行详细的讨论。

黄杆菌（fla. vo. bac. te'ri. um）：这些革兰氏阴性杆菌以其利用植物中的糖类生成黄、红色素而著称。有些菌株为中间营养型，有些是嗜冷菌，它们与冷冻肉制品以及冷冻蔬菜的腐败有关。这个属经过重新分类后，发生了较大的变化，新建了几个新属（如威克斯氏菌属，金黄杆菌属，稳杆菌属，伯杰氏菌属），但其中没有与食品相关的微生物。这些新的属中有些还包括一些鱼类病原体，而且有些属还是嗜盐微生物。

哈夫尼菌（haf'ni. a）：这些革兰氏阴性肠道杆菌在冷冻肉制品以及蔬菜制品的腐败中起着十分重要的作用。蜂房哈夫尼菌是该属中惟一与食品有关的菌株，能运动，对赖氨酸与鸟氨酸敏感，其 DNA 中（G+C）的摩尔分数为 48%～49%。

考克氏菌（ko. cu'ri. a，after M. Kocur）：这是从微球菌属中拆分出来的一个新属[33]。其中 3 个菌株（*K. rosea*，*K. varians*，*K. kristinae*）为氧化酶阴性，过氧化氢酶阳性，其 DNA 中（G+C）的摩尔分数为 66%～75%。

乳球菌（lac. to. ba. cil'lus）：20 世纪 80 年代开始广泛应用的分类学基本原理在这个属中得到了充分的体现。在第 9 版的 Bergey 手册中该属的一些菌株被划分入其他的属。根据 16S-RNA 的序列信息，该属可以分为 3 个明显的组[8]，其中一个组包括魏斯氏菌，因此该属菌株很有可能会被重新分类。该属菌株为革兰氏阳性、过氧化氢酶阴性杆菌，呈长链状。尽管在食品中出现的该属菌株都是典型的微好氧菌，但也有严格意义上的厌氧菌，它们经常出现在人体的粪便以及瘤胃中。虽然不是所有的乳球菌都会与乳酸细菌同时出现，但典型的乳球菌常与乳酸细菌同时出现在蔬菜上，它们通常也存在于日常用品中。最新发现的一个菌株斯瓦比乳球菌是从苹果以及捣碎的梨块中发现的。当 pH 为 2.8 时，斯瓦比乳球菌能够在 12%～16%的乙醇溶液中生长[23]。我们将在第三部分 7 中对乳球菌的发酵产物进行详细的阐述。而那些经常出现在冷冻制品以及真空包装制品的菌株

将在第三部分 5 中讨论。

乳球菌 (lac. to. coc′cus)：血清中的非运动型 N 型球菌，原来属于链球菌属，而现在被单独列为一个属。该属菌株都是革兰氏阳性，非运动型，过氧化氢酶阴性球菌，呈球形或卵形，单个、成对或链状出现。它们能在 10℃下生长，但不能在 45℃下生长。所有的菌株发生 N 型抗血清反应，并在发酵过程中主要产 L-乳酸。

乳杆菌 (leu. co. nos′toc；无色 *nostoc*)：经常与乳酸菌同时出现，是乳酸细菌的另一个属。革兰氏阳性，过氧化氢酶阴性球菌，异型发酵。该属的菌株数减少了很多（见下面的魏斯氏菌）。该属中的酒明串珠菌归入了新的酒球菌属即而改称为酒球菌[11]；而类肠膜明串珠菌也归入了新的魏斯氏菌属；这些过氧化氢酶阴性的球菌进行异型发酵，十分典型地与乳酸菌同时出现。

李斯特菌明串珠菌 (lis. te′ri. a)：该属有 6 株菌株都是革兰氏阳性、无孢子杆菌，与索丝菌属的种间关系密切。而其中还有 7 株菌株如果按照数值分类法分类，其相似值接近 80%。它们具有同样的细胞壁结、脂肪酸和细胞色素。我们将在第七部分 22 中详细介绍。

微球菌 (mi. cro. coc′cus)：革兰氏阳性、过氧化氢酶阳性球菌。有些菌株能产粉红色、橘红色或红色色素，其它菌株则不产色素。大多数菌株都能够耐高浓度的盐，绝大多数菌株为半自养型微生物，而该属却以嗜冷菌株而著称。由于现在重新划分了 5 个新的属（皮生球菌属，考克氏菌属，皮球菌属，涅斯捷连科氏菌属和口腔球菌属），这个大属如同上面所述的考克氏菌属一样变小了。而活泼微球菌现已作为节杆菌归入了节杆菌属；玫瑰色微球菌则归入了嗜盐球菌属。该属种典型的菌株是藤黄微球菌，重新划分后的微球菌属 DNA 中 (G+C) 的摩尔分数为 69%～76%。

莫拉氏菌 (mo. rax. el′la)：这些革兰氏阴性短杆菌有时也被划入不动杆菌属，它们与后者之间的区别在于对青霉素的敏感性、氧化酶阳性以及 DNA 中 (G+C) 的摩尔分数为 40%～46%。该属的部分菌株现归入了新建立的嗜冷细菌属。它们的新陈代谢是氧化性的，同时葡萄糖发酵过程种不产酸。

类芽孢杆菌 (pae. ba. cillus；almost a bacillus)：这个新建立的属主要包括以前属于芽孢杆菌属以及梭状芽孢杆菌的菌株。它们包括以下 11 个种：蜂房类芽孢杆菌、解淀粉类芽孢杆菌、固氮类芽孢杆菌、环状类芽孢杆菌、坚韧类芽孢杆菌、幼虫类芽孢杆菌、浸麻类芽孢杆菌、饲料类芽孢杆菌、马阔里类芽孢杆菌、尘埃类芽孢杆菌和强壮类芽孢杆菌[1,3]。

泛菌 (pan. toc′a)：这个属为革兰氏阴性、无荚膜、无孢子的直杆菌，大部分菌株能够依靠周生的鞭毛运动。广泛分布在植物、种子、土壤、水以及人体标本中。有些为植物病原体。其中四株菌株曾归入肠道细菌属或欧文氏菌属属中。成团泛菌包括成团肠杆菌和草生欧文氏菌以及鸡血藤欧文氏菌；而菠萝泛菌则包括菠萝欧文氏菌和噬夏孢欧文氏菌；斯氏泛菌就是斯氏欧文氏菌；分散泛菌是一株原始菌株。该属菌株的 DNA 中 (G+C) 的摩尔分数为 49.7%～60.6%[27]。

片球菌 (pe. di. o. coc′cus)：这些异型发酵的球菌属于乳酸菌，成对或两平面四个同时出现。乳酸片球菌是其原始菌株，它能引起了 50 多岁男性的败血病。其 DNA 中 (G+

C）的摩尔分数为 34%～44%，我们将在第三部分 7 中进一步讨论。

变形菌（pro′te.us）：这些肠道内革兰氏阴性杆菌，常表现出多种形态，因而得名变形菌。典型的变形菌能够运动，并且在琼脂培养基上大量繁殖。它们是典型的肠道内菌株，通常存在于人体或动物的肠道内。可以从多种蔬菜或肉制品中特别是高温条件下的腐败物中分离得到该属菌株。

假单胞菌（pseu.do′mo.nas）：这些革兰氏阴性杆菌形成了新鲜食品中最大的细菌属。其 DNA 中（G+C）的摩尔分数为 58%～70%，这表明该属具有许多菌株，这一点也已经被证实了。该属菌株是典型的土壤和水生细菌，广泛分布在食品中，特别是蔬菜、肉、家禽和海洋食品中。另外，由于该属许多菌株是嗜冷微生物，因此该属是导致新鲜的冷冻食物腐败的重要细菌。有些细菌腐败时以产生水溶性蓝绿色素而著称，但许多其他食品腐败都没有这种现象。也有一些与植物相关的菌株现在被归入了伯克霍尔德氏菌属[35]，这其中包括能够产生米酵霉的菌株。

交替单胞菌（psy.chro′.bac.ter）：该属是为了将原来属于不动杆菌和莫拉氏菌属中的非运动型革兰氏阴性杆菌分离而建立的。这些圆胖形球菌经常成对出现。它们大多是非运动型、过氧化氢酶以及氧化酶阳性好氧菌，不能发酵葡萄糖。但能在 6.5%的 NaCl 溶液，1℃下生长，不能在 35～37℃下生长。它能水解吐温 80，大多数菌株卵黄反应呈阳性（卵磷脂酶）。该属菌株对青霉素敏感，能够利用氨基戊酸，而其他的不动杆菌属菌株则不能利用。它们与不动杆菌属之间的区别在于氧化酶阳性以及能够利用氨基戊酸，而与非运动型假单孢菌的区别则在于不能利用果糖以及甘油。由于它们与莫拉氏菌十分类似，因此被归入奈瑟氏球菌科科。该属包括无色杆菌以及莫拉氏菌。它们通常存在于肉类、家禽、鱼类或水中[24,29]。

嗜冷杆菌（sal.mon.el′la）：该属的所有菌株都是存在于人体肠胃中的革兰氏阴性肠道细菌，它也是第七部分 23 中的主题。其 DNA 中（G+C）摩尔分数为 58%～70%。

沙门氏菌（ser.ra′ti.a）：这些革兰氏阴性杆菌属肠杆菌科，好氧，能分解蛋白，在适宜的培养基或一些食品上能产红色素，而该属中不产色素的菌株则比较少见。液化沙门氏菌是与食品中毒相关的最常见的菌株，它能够引起冷冻蔬菜以及肉制品的腐败。其 DNA 中（G+C）摩尔分数为 53%～59%。

希瓦氏菌（she.wa.nel′la）：这些细菌曾被归入腐败假单孢菌，后来又被归入腐败交替单胞菌，现在一个新属中的菌株腐败希瓦氏菌。该属菌株都是革兰氏阴性，直形或曲线形杆菌，不产色素，能通过细胞两端的鞭毛运动。氧化酶阳性，其 DNA 中（G—C）的摩尔分数为 53%～59%。该属的其他 3 个菌株分别为羽田氏希瓦氏菌、深海希瓦氏菌以及科氏希瓦氏菌。它们都与水生或海洋动物栖息地有关，而高静水压力可促进深海希瓦氏菌生长。

志贺氏菌（shi.gel′la）：该属中所有菌株都与人体肠道有关，我们将在第七部分 23 中进一步讨论。

葡萄球菌（staph.y.lo.coc′cus；葡萄形球菌）：革兰氏阳性、过氧化氢酶阳性球菌，包括金黄色葡萄球菌。而金黄色葡萄球菌能够引起几种疾病综合征，包括肠胃食物中毒等。我们将在第七部分 20 中对此菌株以及该属的其他菌株做进一步的讨论。

漫游球菌（*vago. coccus*，游动球菌）：该属是根据16S核糖体序列数据从N型乳酸球菌组中分离建立的。它们能够依靠周生鞭毛运动，革兰氏阳性，过氧化氢酶阴性，能够在10℃下生长，但不能在45℃下生长；能在4.5%的NaCl溶液中生长，但不能在6% NaCl溶液中生长；不能在pH9.6下生长。细胞壁肽聚糖结构为赖氨酸-D-Asp，其DNA中（G+C）的摩尔分数为33.6%。该属至少有一个菌株产H_2S，通常存在于鱼类、粪便、水或食物中[3,40]。漫游球菌属与其他相关属的亲源关系将在第七部分22中讨论（图22.1）。

弧菌（vib'ri. o）：革兰氏阴性，直形或弯曲形杆菌，属弧菌科科。该属已有几株菌株划入科斯顿氏菌属属[26]。该属中有几株菌株能够引起人体肠胃疾病或其他疾病，我们将在第七部分25中进一步讨论。其DNA中（G+C）的摩尔分数为38%～51%，见参考文献[11]。

魏斯氏菌（weiss'ella）：该乳酸细菌属建立于1993年，部分属于乳酸菌"leuconostoc branch"属。其中7株菌株与明串珠菌属亲源关系密切。除了类肠膜魏斯氏菌以及希腊魏斯氏菌外，都能发酵葡萄糖产DL型乳酸盐。所有菌株都能够利用碳水化合物产气。希腊魏斯氏菌是一株与希腊香肠发酵有关的新菌株，而类肠膜明串珠菌就是现在的类肠膜魏斯氏菌；混淆魏斯氏菌、耐盐魏斯氏菌、坎氏魏斯氏菌、稍小魏斯氏菌和绿色魏斯氏菌等菌株以前曾归入乳杆菌属。其DNA中（G+C）的摩尔分数为37%～47%。

耶尔森氏菌（yer. si'ni. a）：该属菌株包括鼠疫耶尔森氏菌（人类瘟疫的代名词），并且至少有一株菌株，小肠结肠炎耶尔森氏菌能够引起肠胃食物中毒。第七部分25中将讨论所有与食物中毒有关的菌株。3A生物组中，山梨糖阳性相关的菌株有：莫氏耶尔森氏菌，而山梨糖阴性相关的菌株有：伯氏耶尔森氏菌。

2.4 食品中常见的霉菌属概要

霉菌是以缠结的形式生长的丝状真菌，它可以迅速地蔓延，在2～3d内能够布满几英寸。整个或大部分生物体就称为菌丝团，菌丝团又是由称为菌丝的分枝组成。食品中最重要的霉菌是通过子囊孢子、接合孢子和分生孢子来进行繁殖。有些属的霉菌的子囊孢子具有很突出的耐热性；有些霉菌能形成分生孢子器或分生孢子盘（一种烧瓶形的小子实体上带有孢子梗的皱折）。还有些霉菌能够从菌丝上形成节孢子。

20世纪80年代间食物传播的霉菌的分类没有根本性的改变，最明显的变化就是发现有些熟知的霉菌种属的有性阶段或完整的生长阶段。在这方面，子囊孢子被真菌学家认为是真菌最重要的再生阶段，这一阶段又称为是目的进化（teleomorph），称为目的进化的种名比生物进化的种名更重要，生物进化是一种不完整的或分生孢子阶段。Holomorph表明这二种阶段是大家熟知的，但常用的是目的进化这个词，有关食物传播的霉菌的信息可见参考文献[3,4,28]。

属的分类状况归纳如下[20]，有关鉴定见参考文献[3,4,28]，有关肉中的霉菌的类型见参考文献[20]。

门：接合菌

纲：接合菌

目：Mucorales
科：Mucoraceca
属：毛霉
根霉
枝霉
门：子囊菌
纲：不整子囊菌
目：Eurotiales
科：Trichocomaceae
属：*Byssochlamys*
Eupenicillum
Emericella
Eurotium
门：半知菌
纲：Hypomycetes
目：Hyphomycetales
科：Moniliaceae
属：支链孢属
曲霉
念
葡萄孢属
牙枝霉
镰刀菌属
地霉
长
念珠菌
青霉
单端孢菌

这些属以字母顺序列在下面：

链格孢属：菌丝体有隔膜，产棕色分生孢子。分生孢子具有十字形或纵向隔膜，形状多样（图 2.2A）。该属菌株能够导致苹果、无花果等水果褐变，甚至腐烂。同时，这些菌株也能引起茎干腐烂与柑橘类植物的腐烂。这些野生真菌菌株主要存在于小麦中。另外，在食品行业的红肉中也能发现。该属有些菌株能够产真菌毒素（见第七部分 27）。

曲霉：产链状分生孢子（图 2.2B）。闭囊中的子囊孢于在食品上发育为翅孢壳属，散囊菌属或 Neosartorya。散囊菌属（见前页灰绿曲霉）中所有菌株都是产亮黄色闭囊的耐旱微生物，其中蜡叶散囊菌与葡萄果酱以及果子冻的腐败有关[32]；而翅孢壳属则产白色闭囊，构巢翅孢壳是构巢曲霉的日的进化形式；Neosartorya 也能够产白色闭囊以及无色子囊孢子，但该属中的耐热菌株 *N. fischeri* 其孢子耐热性与丝衣霉属接近。

曲霉属的许多菌株在食物上表现出由黄到绿甚至到黑等不同颜色。其中桃子、柑橘、



图 2.2 常见食物传播霉菌属的图例

无花果等水果中的黑色腐烂只是水果腐败的一种形式。该属菌株通常存在于农村的火腿或熏肉中。其中有些菌株能够引起油类（如棕榈油、花生油或玉米油等）的腐败。该属中的米曲霉与酱油曲霉能形成酱油发酵过程中的生产曲。而灰绿曲霉则能够生产 katsuobushi（一种鱼类发酵制品）；灰绿曲霉与局限曲霉中包含侵袭种子、大豆以及普通豆储存真菌；黑曲霉能够产 β 牛乳糖酶、葡糖淀粉酶、转化酶、脂肪酶以及果胶酶等；米曲霉也产 α-淀粉酶。并且黑曲霉与米曲霉都产黄曲霉毒素，而其他菌株则产赭曲霉素和柄曲霉素（见七部分 27）。

短柄霉：菌株生长前期出现类酵母菌落，然后向四方扩展产生黑色斑点。出芽短柄霉（出芽茁霉）是食品行业中最常见的该属菌株。它与长期储存的牛肉形成的黑色斑点有关，通常存在于小虾、水果以及蔬菜中。

葡萄孢：瘦长形，产多种颜色的分生孢子。菌丝体有隔膜，细胞顶端产灰色或黑色分生孢子，有时产不规则菌核。灰葡萄孢是食品中最常见的该属菌株。它们与苹果、梨、黑莓、草莓、葡萄、越橘、柑橘以及一些核果的灰败有关（见第三部分 8）。

丝衣霉：丝衣霉属是一些拟青霉属属菌株的目的进化形式，但后者在食品行业中没有出现过[28]。子囊菌丝衣霉能够产开阔的丛生子囊，其中每个子囊中都有 8 个子囊孢子，子囊孢子耐热性很高，常常导致一些酸度较高的罐头食品腐败。菌株在生长过程中，能够耐较低的 Ew 值。其中有些菌株能够产果胶酶，而纯黄丝衣霉和雪白丝衣霉破坏罐装或瓶装水果。该属许多菌株都与食物的腐败有关，而纯黄丝衣霉（图 2.3F）在 90℃下的热 D 值为 1～12min，Z 值则达到了 6～7℃[28]。

枝孢霉：菌丝体有隔膜，具有黑色树状不同分枝的出芽分生孢子，因此命名为枝孢霉（图 2.2E）。在培养基中培养时，菌丝体呈绒状，颜色由橄榄绿色变为黑色。有些分生孢子为柠檬形。该属中的菌株多主枝孢是牛肉和冷冻羊肉产生黑点的污染菌；有些菌株则破坏黄油以及人造黄油；有些菌株则导致了核果的轻微腐败以及葡萄的黑色腐烂。这些野生真菌通常存在于大麦以及小麦中。多主枝孢以及芽枝状枝孢是水果与蔬菜中最常见的该属的两株菌株。

刺盘孢霉：属腔孢纲，内部的分生孢子盘能够产分生孢子（图 2.3G）。简单的拉长形分生孢子与透明的分生孢子存在于一个细胞中，分生孢子为卵形或椭圆形。分生孢子层为光滑的圆盘状，大多为黑色。盘长孢状刺盘孢是与食品相关的菌种，它能够引起一些水果特别是热带植物芒果以及番木瓜果的炭疽病（褐色或黑色斑点）。

尖镰孢：大量产淡粉红色、红色、紫色或褐色棉花状菌丝体，具有两端渐细的纺锭状隔膜以及镰刀状分生孢子（macroconidia）（图 2.2F）。它能引起柑橘类水果以及菠萝等褐变，对无花果也有轻微的腐烂作用。作为野生真菌，有些菌株存在于大麦或小麦中。该属菌种中有些菌株能够产玉米烯酮、串珠镰孢菌素、单端孢霉烯等（见第七部分 27）。

白地霉：白色类酵母真菌，菌丝具有隔膜，通过从植物菌丝体形成节状分生孢子进行繁殖，节状分生孢子具有扁平末端。白地霉是双足囊菌属地霉的生物进化形式，是该属中最重要的食品微生物。该菌株因散发出多种类似奶酪的芳香味而被称为日常霉菌，同时由于它在食品加工厂特别是马铃薯罐装制品厂中的食品机械上大量生长而被称为机械霉菌。微白地霉形状见图 2.2G。它们能够引起柑橘类水果和桃子的酸败以及日常奶油的腐败。该属菌种广泛存在于肉类以及许多蔬菜中，有些菌株能够参与夹酸栗果酱饼干的发酵。

丛梗孢：产粉红色、灰色、棕褐色分生孢子，好食从梗孢就是间型脉孢菌的分生孢子期，而从梗孢属是果生链核盘菌的分生孢子期，*M. americana* 如图 2.2J 所示。它们能引起桃子等核果产生褐变甚至腐烂。而链核盘菌则能够引起越橘木乃伊化。

毛霉：菌丝体没有隔膜，具有孢子囊的囊轴直立于孢囊梗顶端。该属的所有菌株都没有假根或匍匐枝，菌落呈棉花状。所谓的牛肉长须以及冷冻羊肉黑斑都是由部分该属菌种引起的。该属中至少有一株菌株，米黑毛霉，能够产脂肪酶。这些菌株主要存在于发酵食品、熏肉和许多蔬菜中。其中有一株菌株能够发酵大豆乳清凝结物。

青霉：以分生孢子方式繁殖，该属现归入半知菌亚门。无论是与踝节菌还是与真青霉的囊孢子闭囊壳后，该属菌种都归入子囊菌类。该属的两中目的进化形式中踝节菌属与食品的关系更为密切[28]。黄踝节菌就是 P. dangeardii 的目的进化形式，它与水果浓缩汁的腐败有关[22]。该菌株也能产耐热的孢子。

当青霉生成分生孢子时，它由瓶梗收缩（见图 2.3A）。该属菌株在食品上的特征颜色是蓝色或蓝绿色。柑橘上的蓝色和绿色霉点，苹果、葡萄、梨以及核果上的蓝色霉点大多都是由该属菌株引起的。该属中有一株菌株 *P. rpqueforti*，能够发酵产奶酪。该属中也有一些菌株能够产橘霉素、黄米毒素、赭曲霉素 A、红青霉毒素 B 以及其他一些真菌毒素（见第七部分 27）。

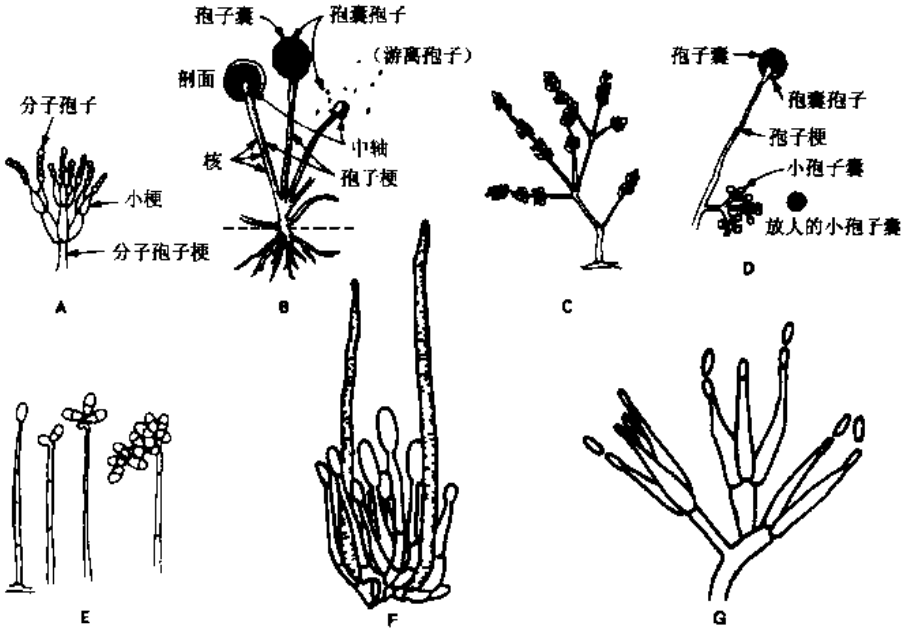


图 2.3 常见食物传播霉菌属的图例

根霉：没有隔膜的菌丝体直立于匍匐枝或假根上。孢囊梗由菌群中假根的生长点的匍匐枝末端产生（见图 2.3B）。匍枝根霉是食品行业中最常见的该属菌种，该菌株有时也被人称为面包霉。该属菌种能够引起苹果、梨、核果、葡萄以及无花果等轻微腐败，并产生水。有些菌株能够引起牛肉以冷冻羊肉黑色斑点。该属菌种通常存在于熏肉以及一些冷冻肉类中，有些菌株能够产果胶酶，而少孢根霉则是 oncom、bonkerk 以及天培生产的重要菌株。

致枝霉：这些霉菌在枝状结构的高处产小型孢子囊（见图 2.3E）。枝霉是该属中惟一与食品有关的菌株。众所周知，它能够在冷冻的牛后腿及牛臀肉上生长，其生长现象表现为须状物质。在腐烂的鸡蛋中很少发现。

木霉：菌丝体有隔膜，具有瘦长简单的分生孢子（见图 2.3D）。玫瑰木霉是该属惟一与食品有关的菌株。由于它呈粉红色，因而经常导致水果的粉红色腐烂。它也能够引起葫芦轻微腐烂，通常存在于大麦、小麦、玉米以及核桃中。有些菌株能够产真菌毒素（见第七部分 27）。

其他霉菌：这里要讨论两类生物体，第一类主要包括头孢属、色二孢属、链孢霉属这些食品中发现但不典型的杂类属。其中头孢属为半知菌类，通常存在于冷冻食品中（见图 2.2D）；镰孢属的一些菌株的微孢子与该属的相似。而色二孢属也属半知菌类，它

是引起柑橘类水果茎干腐烂以及桃褐变腐烂出水的主要菌株。链孢霉属属子囊菌类，所谓的红面包霉就是该属间型脉孢菌。好食丛梗孢是间型链孢霉属生物进化形式，后者是肉类中发现的重要的 oncom 生产菌株。牛肉上的白色斑点是由侧孢菌（见图 2.3C）引起的；而水果的多种腐败则是由盘长孢菌引起的（见图 2.2H）；有些长蠕孢菌（见图 2.2I）是植物病原体，也有一些菌株为腐生物。

第二类主要包括重要的腐败菌嗜旱微生物。除了曲霉以及散囊菌外，Pitt & Hocking[28]中嗜旱微生物还包括 6 个其他属：*Basipetospora*、金孢子菌、单囊霉属、*Polypaecilum*、*Wallemia* 以及 *Xeromyces* 等。这些霉菌的特征为能够在水分活度 A_w 低于 0.85 的条件下生长，因此该类微生物在食品行业中是十分重要的。这里我们仅对 *Wallemia* 以及 *Xeromyces* 进一步讨论。

Wallemia 在培养基以及食品中都产深褐色菌落。该属中 *W. sebi* 因能够在水分活度 A_w 低于 0.69 下生长而著称，在干咸鱼上该菌株能够产暗褐色霉点。

Xeromyces 仅有一株菌株，*X. bisporus*。它能够与易消失的含有 2 个子囊孢子的子囊产无色闭囊壳。这株菌株与其它菌株相比，能够在低的 A_w 下生长[28]。其生长 A_w 上限为 0.97，最适 A_w 为 0.88，最低 A_w 为 0.60。该菌株的热 D 值在 82.2℃下为 2.3min。它能引起甘草、李子脯、巧克力、果汁以及其他类似物质的腐败。

2.5　食品中常见的酵母属概要

与霉菌相比，酵母可以看成是单细胞的霉菌，霉菌则是多细胞的。但是这并非是精确的定义，因为许多通常被看成是酵母的，实际上却能够不同程度地产生菌丝体。

酵母不同于细菌在于酵母的细胞较大，细胞呈卵圆形、椭圆形或球形。典型的酵母细胞的直径为 5～8μm，有些则更大些，较老的酵母其细胞往往较小。食品中大多数重要的酵母可以分为芽殖和裂殖。

酵母可以在较广的酸性 pH 和乙醇浓度高达 18%中生长，许多酵母能够在蔗糖浓度为 55%～60%中生长；酵母还可以产生从奶油色到粉红色、红色的颜色。有些子囊孢子和节孢子相当地耐热（某些像酵母的真菌能够产生子囊孢子）。

至于酵母的分类，在过去的 10 年中使用了一些较新的方法，如 5SrRNA、DNA 碱基组分、辅酶 Q 特征等。由于酵母基因组较大，5SrRNA 的序列分析用子较大的 RNA 片段。在酵母的分类中已经有较多的改进，这部分原因是由于产生了一些新的方法，并且分类表现出具有哲理的聚集分类单位，而不是发散的分类单位。酵母分类最权威的著作是由 Kreger-van Rij 于 1984 年编辑并出版[24]。在这本书中，过去的球拟酵母属已经转入到假丝酵母属，过去的酵母属则归入接合酵母纲和有孢圆酵母属。更多的酵母的月的进化阶段或完整的阶段目前已经清楚，这在较陈旧的文献中是查阅不到的。

食物传播的 14 个酵母属的分类归纳如下。更加完整地讨论食物传播的酵母可参见 Deak 和 Beuchat[13]、Bencke 和 Stevenson[3]、Pitt 和 Hocking[28]的著作。对于食物传播的酵母的鉴定，Deak 和 Beuchat[13]已经提出了简洁有效的途径与方法。对于乳制品中的酵母可以参见参考文献 15；对于肉食中的酵母可以参见参考文献 20。

门：Ascomycotina

科：Saccharomycetaceae

亚科：Nadsonioideae

属：*Hanseniaspora*

亚科：Saccharomycetoideae

属：*Debaryomyces*

Issatchenkia

Kluyveromyces

Pichia

Saccharomyces

Torulaspora

Zygosaccharomyces

亚科：Schizosaccharomycetoideae

属：*Schizosaccharomyces*

门：Deuteromycotina

科：Crypotococcaceae

属：*Brettanomyces*

Candida

Cryptococcus

Rhodotorula

Trichosporon

以上属以字母顺序列在下面：

酒香酵母：这些不产孢子的酵母来自于有尖顶拱的细胞，顶端发芽，在有氧条件下能利用葡萄糖发酵产乙酸，间型酒香酵母是其中最普遍的菌株，它能在pH低至1.8下生长。它能引起啤酒，葡萄酒、软饮料、腌渍品等的腐败，同时也与一些啤酒以及淡色啤酒的后发酵有关。

假丝酵母：这个属是Berkhout于1923建立的，现在其定义以及组成都已经发生了许多变化[38]。按照脂肪酸的组成以及电泳核型分析，作为一个不均匀的分类群，该属可以分为3大类40段[39]。其属名的意思是“亮白色”，但其细胞中不含类胡萝卜素色素。

其子囊菌类部分如下所列：包括一些以前属于球拟酵母属属的菌种：

无色假丝酵母（白色球拟酵母；无名球拟酵母）

乳酒假丝酵母（假热带假丝酵母，乳酒球拟酵母；乳脂圆酵母）

星形假丝酵母（星形球拟酵母）

洪密氏假丝酵母（洪密氏球拟酵母）

许多假丝酵母属的生物进化形式现在都已归入了克鲁维酵母属和毕赤酵母属[113]。解脂假丝酵母就是解脂复膜孢酵母。

这个属的大多数菌株是新鲜的碎牛肉或家禽中最普通的微生物，而该属食品中最常见的菌株则是热带假丝酵母。该属中一些菌株与作为酸乳酒曲成分的可可豆发酵有关，同时也其他发酵产品如啤酒、淡色啤酒以及果汁发酵有关。

隐球酵母：该属主要包括一些线黑粉菌属以及担子菌属属的生物进化形式菌株。它们不产孢子，多侧枝出芽生殖。不能发酵糖，菌体为透明、红色或橙色，产节孢子、普遍存在于植物、土壤、草莓以及其他水果、海洋鱼类、河虾以及新鲜的碎牛肉中。

德巴利酵母：产子囊孢子，有时会产生假菌丝体，多侧枝出芽生殖。它是日用品中最常见的酵母属之一。汉逊德巴利酵母就是以前的类球形德巴利酵母和汉逊有孢圆酵母，它是最常见的食品中毒微生物。它能够在浓度 24% 的 NaCl 溶液以及 A_w 低至 0.65 的条件下生长。同时，它也能导致香肠黏滑，并能在盐水以及奶酪中生长，引起橙汁浓缩汁以及酸奶酪腐败。

有孢汉逊酵母：葡萄酒酵母，其生物进化形式菌株即克勒克酵母菌，它以两端出芽生殖，一般情况下以柠檬形细胞形式存在。其子囊包含 2～4 个帽形孢子。它能够发酵糖，它可在大量食品中特别是无花果、马铃薯、草莓、柑橘类水果以及可可豆发酵过程中存在。

伊氏酵母：该属的菌株能够产假菌丝体，并进行多侧枝出芽生殖。有些种以前曾归入毕赤酵母属，克鲁斯假丝酵母的目的进化形式就是东方伊氏酵母。十分典型的，它们在进行液体发酵时能够产生菌膜。它们含有辅酶 Q-7 并普遍存在于各种食品上。

克鲁维酵母（豆孢酵母）：这些产子囊孢子的酵母以多侧枝芽殖的方式繁殖。孢子的形态为椭圆形。现在马克斯克鲁维酵母包含有以前的胞壁克鲁维酵母、乳酸克鲁维酵母、保加利亚克鲁维酵母、乳酸酵母和胞壁酵母。马克斯克鲁维酵母是牛奶制品中最常见的两种酵母菌之一。克鲁维酵母菌可以产生 β-半乳糖苷酶，可以有效地利用糖（包括乳糖）。马克斯克鲁维酵母含有辅酶 Q-6，参与俄罗斯酸马奶酒的发酵。它还可以用来利用乳清生产乳糖酶，它也是利用乳清生产酵母细胞的有机体之一。在很多种类的水果中都可以发现这些酵母，马克斯克鲁维酵母会引起干酪的酸败。

毕赤酵母：这是存在于酵母中的最大的类。它们以多侧枝芽殖方式繁殖，子囊通常包含有 4 个椭圆球形，帽子形或火星形形态。它们可能会形成假菌丝体和结孢子。一些孢子的前期形态为帽子形态的可能是拟威尔酵母菌，以前的一些种现在归入到德巴利酵母种中。季也蒙毕赤酵母是季也蒙假丝酵母的理想状态。膜醭毕赤酵母是粗壮假丝酵母的变形。毕赤酵母菌在液体培养基中通常会形成膜，且已清楚，它对在世界各地生产的本地食品很重要。它在活鱼和活虾体内可以发现一些，它们可以在橄榄盐水中生长，引起泡菜的腐败。

红酵母：这些酵母是担子菌类的变形。红冬孢酵母类产生冬孢子。它们以多侧枝芽殖方式繁殖，不具发酵性。红酵母和胶红酵母是食品中最常见的两种微生物。它们产生红色素形成粉红色，最常见的颜色是橘黄色和鲜肉的粉红色。种类酵母包含有许多适冷的种/菌，可以在活家禽，活虾、活鱼和鲜牛肉上找到。有一些还可以在黄油的表面生长。

酵母：这些产子囊孢子的酵母以多侧枝芽殖的方式繁殖产椭圆形的子囊。它们是双倍体，不发酵乳糖。曾被归入二孢酵母属和鲁酵母属的那些酵母现在属于结合酵母属类，原来的罗斯酵母现归入有孢圆酵母属类中。所以面包酵母、啤酒酵母、葡萄酒酵母和香槟酒酵母都属于酿酒酵母。尽管酿酒酵母很少引起酸败，但仍可以在乳酸酒的颗粒中发

现这类菌，还可以从许多食物中如风干的意大利腊肠和多种水果中分离出这些菌。拜尔酵母是一种腐败酵母，在番茄酱、蛋黄酱，沙拉调味酱，软饮料，水果汁，苹果酒和葡萄酒中具有较高活性。它们耐苯甲酸盐和吸附式防腐剂。

裂殖酵母：这类产子囊孢子的酵母通过形成的十字墙侧枝分裂繁殖，可以产生真菌丝和结孢子。4～8个的子囊为豆形，不出芽。一般认为它们和真酵母的关系较远。粟酒裂殖酵母是最常见的种，它耐高渗，对一些化学防腐剂有抗性。

有孢圆酵母：多侧枝出芽的繁殖方式，产生椭圆球形子囊。原来的酵母属类中的三种单倍体酵母现在属于这类。它们能强烈发酵糖，含有辅酶Q-6。戴尔有孢圆酵母是这类中最常见的种。

丝孢酵母：这类不产生子囊孢子的氧化酵母以出芽方式和形成节分生孢子的方式繁殖。它们形成真菌丝，发酵糖的能量很弱，甚至没有。它们参与可可豆和黑绿豆靡饼的发酵，可以从活虾，黄牛肉，家禽，冻羊肉和其它食品中得到这些微生物，茁芽丝孢酵母是最常见的该类菌，它可以产生脂肪酶。

结合酵母：繁殖方式为多侧枝出芽，形成的豆形囊孢子常常从子囊孢子中释放出来。大多数是单倍体，它们能强烈发酵糖。鲁氏结合酵母是最常见的该类菌，它们可以在A_w为0.62下生长，可以生长的A_w仅比Xeromyces bisporus高。它们当中的一些可以参与酱油和味噌的发酵，它们当中的一些可以竞争性地利用蛋黄酱和沙拉调味酱，特别是拜氏结合酵母可以在pH为1.8的环境下生长。

参 考 文 献

[1] Ash, C., F. G. Priest, and M. D. Collins. 1993. Molecular identification of rRNA group 3 bacilli (Ash, Farrow, Wallbanks and Collins) using a PCR probe test. *Antonie can Leeuwenhoek* 64: 253～260.

[2] Ash, C., J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and M. D. Collins. 1991. Phylogenetic heterogeneity of the genus *Bacillus* revealed by comparative analysis of small-subunit-ribosomal RNA sequences. *Lett. Appl. Microbiol.* 13: 202～206.

[3] Beneke, E. S., and K. E. Stevenson. 1987. Classification of food and beverage fungi. In *Food and Beverage Mycology*. 2d ed., ed. L. R. Beuchat, 1～50. New York: Van Nostrand Reinhold.

[4] Beuchat, L. R., ed. 1987. *Food and Beverage Mycology*, 2d ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

[5] Champomier, M. -C., M. -C Montel, and R. Talon. 1989. Nucleic acid relatedness studies on the genus *Carnobacterium* and related taxa. *J. Gen. Microbiol.* 1391～1394.

[6] Collins, M. D., P. A. Lawson, A. Willems, J. J. Cordora, J. Fernandez-Garayzabal, P. Garcia, J. Cai, H. Hippe, and J. A. E. Farrow. 1994. The phylogeny of the genus *Clostridium*: Proposal of five new genera and eleven new species combinations. *Int. J. System. Bacteriol.* 44: 812～826.

[7] Collins, M. D., J. Samelis, J. Metaxopoulos, and S. Wallbanks. 1993. Taxonomic studies on some leuconostoc like organisms from fermented sausages: Description of a new genus *Weissella* for the *Leuconostoc paramesenteroides* group of species. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 595～603.

[8] Collins, M. D., U. Rodrigues, C. Ash, M. Aguirre, J. A. E. Farrow, A. Martinez-Murcia, B. A. Phillips, A. M. Williams, and S. Wallbanks. 1991. Phylogenetic analysis of the genus

Lactobacillus and related lactic acid bacteria as determined by reverse transcriptase sequencing of 16S rRNA. *FEMS Microbiol. Lett.* 77: 5～12.

[9] Collins. M. D., C. Ash, J. A. E. Farrow, S. Wallbanks, and A. M. Williams. 1989. 16S ribosomal ribonucleic acid sequence analyses of lactococci and related taxa. Description of *Vagococcus fluvialis* gen. nov., sp nov. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 453～460.

[10] Collins, M. D., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, S. Ferusu, and D. Jones. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. System. Bacteriol.* 37: 310～316.

[11] Colwell, R. R., ed. 1984. *Vibrios in the Environment*. New York: Wiley.

[12] Coyne, V. E., C. J. Pillidge, D. D. Sledjeski, H. Hori. B. A. Ortiz-Conde, D. G. Muir, R. M. Weiner, and R. R. Colwell. 1989. Reclassification of *Alteromonas colwelliana to the genus Shewanella* by DNA-DNA hybridization, serology and 5S ribosomal RNA sequence data. *System. Appl. Microbiol.* 12: 275～279.

[13] Deak, T., and L. R. Beuchat. 1987. Identification of foodborne yeasts. *J. Food Protect.* 50: 243～264.

[14] Dicks, L. M. T., Dellaglio, F., and M. D. Collins. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 395～397.

[15] Fleet, G. H. 1990. Yeasts in dairy products. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 199～211.

[16] Gauthier, G., M. Gauthier, and R. Christen. 1995. Phylogenetic analysis of the genera *Alteromonas*, *Shewanella*, and *Moritella* using genes coding for small-subunit rRNA sequences and division of the genus *Alteronomas* into two genera, *Alteromonas* (emended) and *Pseudoalteromonas* gen. nov., and proposal of twelve new species combinations. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 755～761.

[17] Gavini, F., J. Mergaert, A. Beji, C. Mielcarek, D. Izard, K. Kersters, and J. de Ley. 1989. Transfer of *Enterobacter agglomerans* (Beijerinck 1888) Ewing and Fife 1972 to *Pantoea* gen. nov. as *Pantoea agglomerans* comb. nov. and description of *Pantoea dispersa* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacteriol.* 39: 337～345.

[18] Golledge, C. L., N. Stingemore, M. Aravena, and D. Joske. 1990. Septicemia caused by vancomycin-resistant *Pediococcus acidilactici*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1678～1679.

[19] Holzapfel, W. H., and E. S. Gerber. 1983. *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L (+) -lactate. *System. Appl. Microbiol.* 4: 522～534.

[20] Jay, J. M. 1987. (Fungi in) meats, poultry, and seafoods. In *Food and Beverage Mycology*, 2d ed., ed. L. R. Beuchat, 155～173. New York: Van Nostrand Reinhold.

[21] Juni, E., and G. A. Heym. 1986. *Psychrobacter immobilis* gen. nov., sp. nov.: Genospecies composed of gram-negative, aerobic, oxidase-positive coccobacilli. *Int. J. System. Bacteriol.* 36: 388～391.

[22] King, A. D., Jr., and W. U. Halbrook. 1987. Ascospore heat resistance and control measures for *Talaromyces flavus* isolated from fruit juice concentrate. *J. Food Sci.* 52: 1266, 1252～1254.

[23] Kleynmans, U., H. Heinzl, and W. P. Hammes. 1989. *Lactobacillus suebicus* sp. nov., an obligately heterofermentative *Lactobacillus* species isolated from fruit mashes. *System. Appl. Bacteriol.* 11: 267～271.

[24] Kreger-van Rij, N. J. W., ed. 1984. *The Yeasts, A Taxonomic Study*. Amsterdam: Elsevier.

[25] Lane, D. J., B. Pace, G. J. Olsen, D. A. Stahl, M. L. Sogin, and N. R. Pace. 1985. Rapid determination of 16S ribosomal RNA sequences for phylogenetic analyses. *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA* 82: 6955～6959.

[26] MacDonell, M. T., and R. R. Colwell. 1985. Phylogeny of the Vibrionaceae, and recommendation for two new genera, *Listonella* and *Shewanella*. *System. Appl. Microbiol.* 6: 171～182.

[27] Mergaert, J., L. Verdonck, and K. Kersters. 1993. Transfer of *Erwinia ananas* (synonym, *Erwinia uredovora*) and *Erwinia stewartii* to the genus *Pantoea* emend. as *Pantoea ananas* (Serrano1928) comb. nov. and *pantoea stewartii* (Smith1898) comb. nov., respectively, and description of *Pantoea stewartii* subsp. *indologenes* subsp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 43: 162～173.

[28] Pitt, J. I., and A. D. Hocking. 1985. *Fungi and Food Spoilage*. New York: Academic Press.

[29] Shaw, B. G., and J. B. Latty. 1988. A numerical taxonomic study of non-motile non-fermentative gram-negative bacteria from foods. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 7～21.

[30] Smibert, R. M. 1978. The genus *Campylobacter*. *Ann. Rev. Microbiol.* 32: 673～709.

[31] Sneath, P. H. A., and D. Jones. 1976. *Brochothrix*, a new genus tentatively placed in the family Lactobacteriaceae. *Int. J. System. Bacteriol.* 26: 102～104.

[32] Splittstoesser, D. F., J. M. Lammers, D. L. Downing, and J. J. Churey. 1989. Heat resistance of *Eurotium herbariorum*, a xerophilic mold. *J. Food Sci.* 54: 683～685.

[33] Stackebrandt, E., C. Koch, O. Gvozdiak, and P. Schumann. 1995. Taxonomic dissection of the genus *Micrococcus*: *Kocuria* gen. nov., *Nesterenkonia* gen nov., *Kytococcus* gen. nov., *Dermacoccus* gen. nov., and *Micrococcus* Cohn 1872 gen. emend. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 682～692.

[34] Talon, R., P. A. D. Grimont, F. Grimont, F. Gasser, and J. M. Boeufgras. 1988. *Brochothrix campestris* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 38: 99～102.

[35] Urakami, T., C. Ito Yoshida, H. Araki, T. Kijima, K. I. Suzuki, and K. Komagata. Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 44: 235～245.

[36] Vandamme, P., J. -F. Bernardet, P. Segers, K. Kersters, and B. Holmes. 1994. New perspectives in the classification of the flavobacteria: Description of *Chryseobacterium* gen. nov., *Bergeyella* gen. nov., and *Empedobacter* nom. rev. *Int. J. System. Bacteriol.* 44: 827～831.

[37] Vandamme, P., E. Falsen, R. Rossau, B. Hoste, P. Segers, R. Tytgat, and J. deLey. 1991. Revision of *Campylobacter*, *Helicobacter*, and *Wolinella* taxonomy emendation of generic descriptions and proposal of *Arcobacter* gen. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 41: 88～103.

[38] Viljoen, B. C. and J. L. F. Kock. 1989. The genus *Candida* Berkhout nom. con-serv. A historical account of its delimitation. *System. Appl. Microbiol.* 12: 183～190.

[39] Viljoen, B. C., and J. L. F. Kock. 1989. Taxonomic study of the yeast genus *Candida* Berkhout. *System. Appl. Microbiol.* 12: 91～102.

[40] Wallbanks, S., A. J. Martinez-Murcia, J. L. Fryer, B. A. Phillips, and M. D. Collins. 1990. 16S rRNA sequence determination for members of the genus *Carnobacterium* and related lactic acid bacteria and description of *Vagococcus salmoninarum* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 40: 224～230.

[41] Wauters, G., M. Janssens, A, G. Steigerwalt, and D. J. Brenner. 1988. *Yersinia mollaretti*

sp. nov. and *Yersinia bercovieri* sp. nov., formerly called *Yersinia enterocolitica* biogroups 3A and 3B. *Int. J. System. Bacteriol.* 38: 424~429.

[42] Wayne, L. G., D. J. Brenner, R. R. Colwell, P. A. D. Grimont, O. Kandler, M. I. Krichevsky, L. H. Moore, W. E. C. Moore, R. G. E. Murray, E. Stackebrandt, M. P. Starr, and H. G. Truper. 1987. Report of the ad hoc committee on reconciliation of approaches to bacterial systematics. *Int. J. System. Bacteriol.* 37: 463~464.

[43] Wisotzkey, J. D., P. Jurtshuk, Jr., G. E. Fox, G. Deinhard, and K. Poralla. 1992. Comparative sequence analysis on the 16S rRNA (rDNA) of *Bacillus acidocaldarius*, *Bacillus acidoterrestris*, and *Bacillus cicloheptanicus* and proposal for creation of a new genus, *Alicyclobacillus* gen. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 42: 263~69.

[44] Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221~271.

[45] Zhao, N., C. Qu, E. Wang, and W. Chen. 1995. Phylogenetic evidence for the transfer of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme et al. 1960) to the genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) comb. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 600~603.

3. 影响微生物生长的食品内在和外在因素

由于食物来源于动物和植物，因此值得对影响微生物生长的动、植物组织的特征进行研究。作为食物的动、植物已经渐渐形成了防止微生物侵染和繁殖的所有机理，有些机理还影响到新鲜的食品。通过认真思考这些自然规律，人们能够有效地利用其中一些或所有的机理来防止和延缓微生物对动、植物来源的食品的腐败。

3.1 内在因素

动、植物组织自身固有的因素就称为内在因素[75]，内在因素如下：

(1) pH

(2) 含水量

(3) 氧化还原电势

(4) 营养成分

(5) 抗微生物成分

(6) 生物结构

接下来将详细讨论每个因素，着重论述对食品中微生物的影响。

3.1.1 pH

已经证实绝大多数的微生物在 pH7.0 左右 (6.6～7.5) 时生长得最好，也有很少的微生物在 pH4.0 以下也能够生长(图 3.1)。细菌对 pH 的要求比酵母和霉菌更加苛刻，其中病原菌最为挑剔。图 3.1 中微生物的最低和最高 pH 并不是严格的界限，因为真正的 pH 还取决于其他生长因素。例如，研究已经表明乳杆菌的最低 pH 取决于所用的酸的类型，使用柠檬酸、盐酸、硫酸和衣康酸要比醋酸和乳酸能使微生物在更低 pH 的环境中生长[91]。已经证明粪产碱杆菌在 0.2mol/L 的 NaCl 中要比在没有 NaCl 以及在 0.2mol/L 的柠檬酸钠中有更广的 pH 生长范围 (图 3.2)。在表 3.1 中列出的食物中可见：水果、软饮料、醋和葡萄酒的 pH 低于细菌通常能够生长的 pH。这类产品良好的耐藏性很大程度上是因为 pH 的原因。经常可以看到水果出现霉菌腐败，这是因为这些霉菌在 pH 低于 3.5 时也能够生长 。pH 低于 3.5 已经低于大多数食品腐败和食物中毒的微生物生长的最低 pH，参见表 3.2。从表 3.3 可以看出：大多数的肉和海产食品的 pH 是在 5.6 左右或 5.6 以上。这就使这些食品不仅对酵母和霉菌腐败非常敏感，而且对细菌也很敏感。大多数的蔬菜比水果有较高的 pH，因此细菌比真菌更加容易腐败蔬菜。

关于肉的耐藏性能，众所周知疲惫的动物的肉比睡眠的动物的肉腐败的更快，直接的结果就是动物完全僵直以后的 pH 的原因。当睡眠很好的动物死亡以后，有 1% 的糖原转变成为乳酸，就直接引起不同的动物的 pH 从 7.5 降低到 5.6。Callow[20]发现：牛肉在

僵直之后最低的 pH 为 5.1，最高的 pH 为 6.2。牛僵直后通常的 pH 大约为 5.6 左右[7]。他还发现羊肉与猪肉最低与最高的 pH 分别为 5.4 与 6.7、5.3 与 6.9。Rriskey [8] 的研究指出：猪肉最终的 pH 在某些条件下可以低到 5.0。pH 的高、低对微生物，尤其是细菌的影响是显而易见的。对于鱼来讲，已经知道拟庸鲽通常最终的 pH 大约为 5.6，这种鱼要比大多数其他鱼具有更好的耐藏性，一般鱼的 pH 在 6.2～6.6 之间[90]。

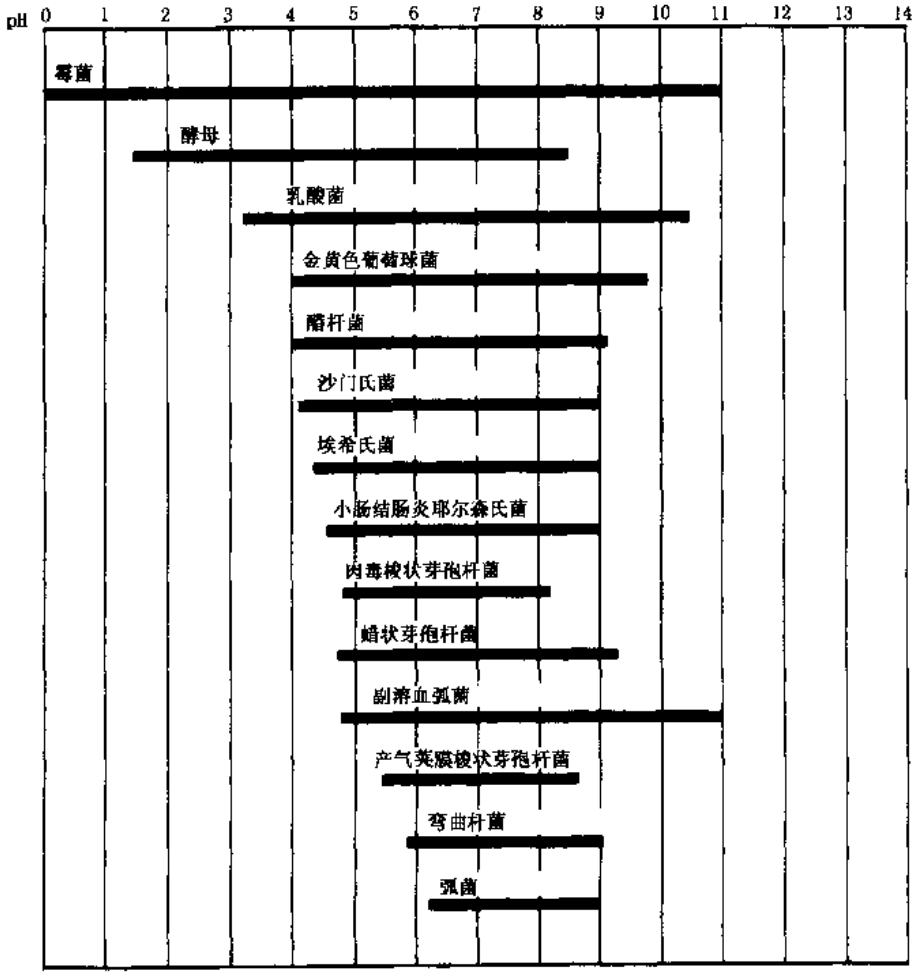


图 3.1　一些食物传播的微生物生长的 pH 范围

表 3.1　　新鲜水果和蔬菜的 pH

蔬　菜	pH	水　果	pH
芦笋（花与茎）	5.7～6.1	苹果	2.9～3.3
豆（青刀豆利马豆）	4.6～6.5	（苹果酒	3.6～3.8）
甜菜（糖）	4.2～4.4	香蕉	4.5～4.7
茎椰菜	6.5	无花果	4.6
球芽甘蓝	6.3	葡萄柚（汁）	3.0
包心菜（青）	5.4～6.0	柠檬	1.8～2.0
胡萝卜	4.9～5.2；6.0	白兰瓜	6.3～6.7

续表

蔬　菜	pH	水　果	pH
花椰菜	5.6	橙	3.6～4.3
芹菜	5.7～6.0	李	2.8～4.6
玉米（甜）	7.3	西瓜	5.2～5.6
黄瓜	3.8	葡萄	3.4～4.5
茄子	4.5		
莴苣	6.0		
橄榄	3.6～3.8		
洋葱（红）	5.3～5.8		
荷兰芹	5.7～6.0		
防风	5.3		
马铃薯（块茎和甜）	5.3～5.6		
南瓜	4.8～5.2		
大黄	3.1～3.4		
菠菜	5.5～6.0		
西葫芦	5.0～5.4		
西红柿	4.2～4.3		
芜菁	5.2～5.5		

表 3.2　　食品传播的微生物生长的最低 pH

	最低 pH
气单胞菌	约 6.0
脂环酸杆菌	2.0
蜡状芽孢杆菌	4.9
肉毒梭状芽孢杆菌，Group Ⅰ	4.6
肉毒梭状芽孢杆菌，Group Ⅱ	5.0
产气荚膜梭状芽孢杆菌	5.0
大肠杆菌 0157：H7	4.5
葡糖杆菌	3.6
短乳杆菌	3.16
植物乳杆菌	3.34
乳酸乳球菌	4.3
单核细胞增生李斯特菌	4.1
类志贺邻单胞菌	4.5
每实假单胞菌	约 5.0
沙门氏菌	4.05
腐败希瓦氏菌	约 5.4
费氏志贺氏菌	约 5.5
索氏志贺氏菌	5.0
金黄色葡萄球菌	4.0
副溶血弧菌	4.8
小肠结肠炎耶尔森氏菌	4.18

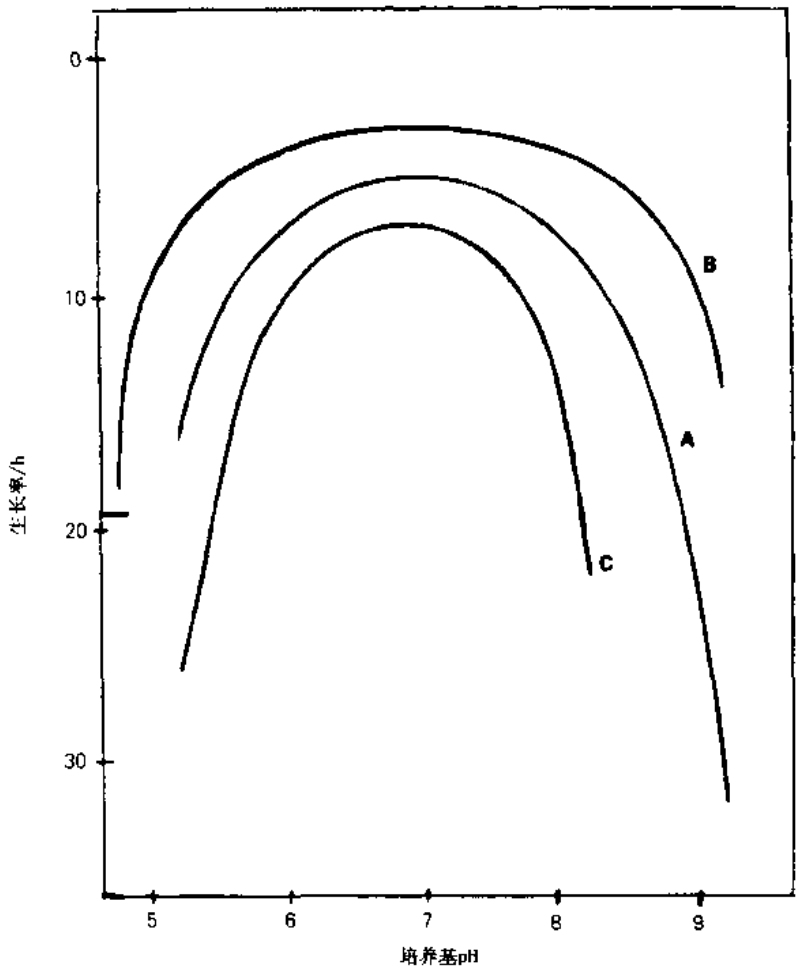


图 3.2　pH、NaCl、柠檬酸钠与在 1%的蛋白胨中产碱杆菌生长率的关系

注：A=1%蛋白胨；B=1%蛋白胨+0.2mol/L NaCl；C=1%蛋白胨+0.2mol/L 柠檬酸钠[10]。

表 3.3　　乳品、肉禽、家禽和鱼制品的食品传播的微生物生长的最低 pH

产　品	pH	产　品	pH
乳制品		鱼和贝类	
奶油	6.1～6.4	鱼（大多数）	6.6～6.8
酪乳	4.5	蛤	6.5
牛奶	6.3～6.5	蟹	7.0
稀奶油	6.5	牡蛎	4.8～6.3
奶酪	4.9；5.9	金枪鱼	5.2～6.0
肉和家禽制品		虾	6.8～7.0
牛肉（碎）	5.1～6.2	大麻哈鱼	6.1～6.3
火腿	5.9～6.1	烟熏鲱鱼	5.5
小牛肉	6.0		
鸡	6.2～6.4		

有些食品本身就带有酸性，而其他的食品的酸性则是由于某些微生物作用产生的结果。微生物作用产生的酸性就称之为生物酸性，例如，发酵乳和泡菜和腌菜中的酸。不管酸的来源如何，对于耐藏性的作用都相同。

有些食品能够较好地耐 pH 的变化，据说这些能耐 pH 变化的食品具有缓冲性。一般来讲，肉食比蔬菜具有较高的缓冲能力。赋予肉食较强缓冲能力的物质是各种蛋白质。蔬菜的蛋白质含量较低，因此在微生物生长过程中就缺乏抗 pH 变化的缓冲能力（蔬菜的化学组成参见表 8.4）。

人们想到了运用食品中天然的酸性来保护动、植物组织免遭微生物腐败的自然途径。十分有趣的是水果的 pH 低于许多腐败微生物的要求，果实的生物学功能就是防止植物的生殖体——种子的形成，这在当今水果的进化过程中毫无疑问是一个十分重要的事实。虽然活的动物的 pH 有利于大多数腐败微生物的繁殖，但是其他内在的因素的作用却使动物有机体得以生存和生长。

pH 的影响：pH 对微生物呼吸的负面影响至少有二方面：即酶的作用和细胞营养物的输送。H^+ 和 OH^- 离子透不过微生物的细胞质膜，因此尽管培养基环境的 pH 可能会发生许多变化，但是细胞质中的这些离子的浓度却保持着相对的恒定[94]。Conway 和 Downey[28]发现静止的面包酵母细胞内部的 pH 为 5.8。在葡萄糖发酵过程中，细胞外部为较酸性的环境，而细胞内部却保持比较碱性的环境。另一方面，Pena 等人[83]不赞同随着培养基环境 pH 的改变酵母细胞仍然维持恒定的 pH 这个看法。似乎几乎所有细胞内部的 pH 都是接近中性，但是，像硫化叶菌和甲烷球菌这样的细菌可能是个例外。当把微生物放入高于或低于中性的环境中时，细胞的繁殖能力取决于它们将环境 pH 变更适宜的 pH 范围的能力。在酸性环境中，细胞要么阻止 H^+ 进入细胞，或者在 H^+ 进入时尽快地排出 H^+。像 DNA 和 ATP 这样的细胞的重要化合物需要中性环境。大多数微生物在酸性培养基中生长时，它们的代谢活性会使培养基或底物的酸性渐渐降低，而在较高 pH 的环境中时微生物将会降低 pH。当细胞生长在酸性范围中时，氨基酸脱羧酶会自动地调整 pH 趋于中性，氨基酸脱羧酶的最适 pH 为 4.0，在 pH5.5 时该酶几乎没有活力。有些细菌，如丙酮丁醇梭状芽孢杆菌通过将丁酸还原为丁醇，能够提高底物的 pH，而产气肠杆菌能够将丙酮酸转化成乙偶姻，从而升高生长环境的 pH。氨基酸脱羧以后，产生的胺可以升高 pH。在碱性范围内生长时，由于有机酸的积累，最适 pH 为 8.5 的一类氨基酸脱胺酶能够将 pH 自动地向中性进行调节。

至于营养物的输送，细菌细胞趋于带有残留的负电荷，因此，非离子的化合物就能够进入细胞，而离子化合物则不能进入。在中性或碱性 pH 条件下，有机酸无法进入细胞，但在酸性 pH 条件下，有机酸是非离子型就能够进入带有负电荷的细胞。侧链离子化基团的离子特征会受到每一个中性侧链的影响，结果就导致细胞膜和传递酶的变性。

在 pH 对微生物的副作用中还有 H^+ 与细胞质膜上的酶之间的作用。有些微生物的形态会受到 pH 的影响。据研究报道：当 pH 增高到 6.0 以上产黄青霉在连续培养时，其菌丝的长度会减短。在 pH 大约 6.7 时形成的是菌丝球，而不是菌丝[91]。细胞外的 H^+ 和 K^+ 也会处于竞争之中，例如，虽然 H^+ 会抑制发酵，但是 K^+ 却能够增强发酵。在酸性培养基中，酵母细胞的葡萄糖代谢很明显地受到 K^+ 的促进作用[35]。有 K^+ 存在的厌氧条件下，

83%的葡萄糖被迅速地消耗；在好氧条件下只能消耗63%的葡萄糖。

其他环境因素能与pH相互影响。对于温度来讲，随着温度的升高，底物pH会变的更加酸性。正如图3.2所示，盐浓度对pH生长曲线有一定的影响，可见加入0.2mol/L NaCl能够拓宽粪产碱杆菌的pH生长范围。这些研究者还发现大肠杆菌也有类似的结果。当盐浓度超过了最适量时，pH生长范围就变的狭小。pH的负面影响还会使得细胞对许多有毒试剂非常敏感，幼小细胞对pH的变化的敏感性要比衰老细胞和静止细胞要大。

当微生物在其最适pH范围生长时，会延长其对数生长期。相比于缓冲能力差的底物，如果底物具有较高缓冲能力，对数生长期预计能够长一些。换句话说，对数生长期的长短，能够反映出微生物将外部环境处于最适pH生长范围所必需的时间。对造成pH负面作用的底物的分析，这不仅对于确定微生物的生长速度，而且对于确定沙门氏菌开始生长所需的最低pH都有十分重要的意义。Chung和Geopfert[26]发现使用盐酸和柠檬酸时，最低pH为4.05，但是在乙酸和丙酸环境中，最低pH分别为5.4和5.5。毫无疑问，这反映出在盐酸以及柠檬酸而不是其他酸的实验条件下，微生物将外部环境改变成其适宜的范围的能力。在以有机酸作为生长抑制剂方面，除了pH以外，其他因素也可能显示出了不同的能力。有关pH和酸度的更进一步的信息可以参见Corlett和Brown的论述[29]。

3.1.2 含水量

最古老的食品保藏的方法之一就是干燥。这一方法具体是如何被使用的却不得而知。干燥保藏食品直接的原因就是将食品中的水分去除，没有水微生物就无法生长。一般都公认微生物对水分的要求应该用环境的水分活度（A_w）来表示。水分活度定义为食物中水蒸气的压力与同温度条件下纯水的蒸汽压的比值——$A_w=p/p_0$，这里p是溶液的蒸汽压，p_0是溶剂（通常为水）的蒸汽压。这个水分活度的概念与相对湿度（R.H）有关，具体关系如下：$R.H=100\times A_w$[23]。纯水的A_w是1.00，22%NaCl溶液的A_w是0.86，饱和NaCl溶液的A_w是0.75（参见表3.4）。

表3.4　　水分活度与氯化钠浓度之间的关系

水分活度 (A_w)	NaCl浓度	
	mol/L	g/L
0.995	0.15	90
0.99	0.30	17
0.98	0.61	35
0.96	1.20	70
0.94	1.77	100
0.92	2.31	130
0.90	2.83	160

续表

水分活度 (A_w)	NaCl 浓度	
	mol/L	g/L
0.88	3.33	190
0.86	3.81	220

注：摘自《肉与肉制品科学》。

大多数新鲜食品的水分活度都在 0.99，据报道，食品中微生物生长所需最低的水分活度列在表 3.2 中（还可以参见第三部分 7）。一般来讲，细菌的生长比霉菌生长要求更高的水分活度，革兰氏阴性菌对水分活度的要求比革兰氏阳性菌要高。绝大多数腐败细菌在 A_w 低于 0.9 以下就无法生长，而霉菌在低至 0.8 时也能够生长。对于食品中毒的细菌来讲，金黄色葡萄球菌在 A_w 低到 0.86 时还能够生长，而肉毒梭状芽孢杆菌在 A_w 低于 0.94 时就不能生长。正如酵母和霉菌生长的 pH 范围要比细菌广泛一些，对于 A_w 来讲，情况也是相同的。据报道，在各种细菌中，最低的 A_w 的细菌是嗜盐细菌，其 A_w 为 0.75，而嗜旱霉菌和嗜渗透压酵母分别能在 A_w 为 0.65 和 0.61 条件下生长。使用盐来控制 A_w 时，最高的 A_w 水平在 0.80 以下（表 3.5）。

表 3.5　　食品重要微生物生长的最低水分活度（A_w）

微　生　物	A_w	微　生　物	A_w
类别		类别	
大多数细菌	0.9	嗜盐细菌	0.75
大多数酵母	0.88	嗜旱霉菌	0.61
大多数霉菌	0.80	嗜渗透压酵母	0.61
特别微生物		特别微生物	
肉毒梭状芽孢杆菌，E 型	0.97	*Scottii* 假丝酵母	0.92
假单孢菌	0.97	普鲁兰丝孢酵母	0.91
不动杆菌	0.96	*Zeylanoides* 假丝酵母	0.90
大肠杆菌	0.96	金黄色葡萄球菌	0.86
产气肠杆菌	0.95	柠檬链格孢	0.84
枯草芽孢杆菌	0.95	*Patulum* 青霉	0.81
肉毒梭状芽孢杆菌，A，B 型	0.94	淡蓝色曲霉*	0.70
产蛋白假丝酵母	0.94	圆锥曲霉	0.70
副溶血弧菌	0.94	*Echinulatus* 曲霉	0.64
灰葡萄孢	0.93	鲁氏接合酵母	0.62
匍枝根霉	0.93	*Xeromyces bisporus*	0.61
刺囊毛霉	0.93		

* 淡蓝色曲霉可以在 *Eurotium* 中查到。

研究已经表明 A_w、温度与营养之间存在着一定的关系。首先，在任何温度下，随着 A_w 的下降，微生物生长的能力逐渐降低；第二，在最适生长温度下，微生物生长的 A_w 范围最广；第三，营养物能够拓宽微生物生存的 A_w 的范围[73]。表 3.5 中给出的 A_w 应该只能作为参考，因为温度以及营养物含量的变化都能使微生物在较低的 A_w 条件下生长。

低水活度（A_w）的影响：在最适条件下，降低水活度将会延长微生物对数期生长的时间；也会降低微生物的生长速率和最终的细胞数。也许降低水含量对微生物所有的代谢活动会产生相反的影响，因为细胞中所有的化学反应都需要有一个合适含水的环境。但是，必须记住的是：A_w 会受到其他环境因素的影响，如 pH、生长温度以及 Eh。Wodzinski 和 Frazier[113]在研究 A_w 对培养基中产气肠杆菌生长时发现：随着 A_w 的降低，微生物的对数生长期和倍增时间会逐渐的延长直到停止生长。但是，最低 A_w 会在培养温度降低的时候有所提高。当 pH 和培养温度都不适合的时候，微生物生长的最低 A_w 相对较高。Horner 和 Anagnostopoulos[55]研究了 A_w、pH 和温度之间的相互作用对果酱上霉菌的生长的影响，其中 A_w 和温度间的关系最为重要。

一般来讲，微生物抗渗透压的办法就是在细胞内积累合适的溶质。细菌积累的溶质包括 K^+、谷氨酸、谷氨酰胺、脯氨酸、γ-氨基丁酯、丙氨酸、甘氨酸甜菜碱、蔗糖、海藻糖和葡萄糖甘油。革兰氏阴性菌往往通过增强传输机理来积累脯氨酸。研究表明脯氨酸通过采用低亲和传输系统来增强金黄色葡萄球菌在高渗培养基中的生长[107]。耐盐和耐旱的真菌往往产生像甘油、赤藓醇和阿拉伯醇的多元醇。没有任何迹象何以表明生长在积聚 K^+、甜菜碱和谷氨酸的培养基中的单核细胞增生李斯特菌积累脯氨酸[82]。单核细胞增生李斯特菌的氨基酸含量从无 NaCl 时的 166mmol/L 增加到 7.5% NaCl 时的 716mmol/L，其中甘氨酸和丙氨酸的增加量最多[82]。另一个研究表明，单核细胞增生李斯特菌在 5 种氨基酸和葡萄糖组成的培养基中能够积累若干耐渗透的物质，但是研究者指出肉毒碱（β-羟基-γ-*N*-三甲基氨基丁酸酯）可能是肉食和肉制品中主要的溶质，它能够使单核细胞增生李斯特菌在渗透的压力中生长[8]。鉴于单核细胞增生李斯特菌在 4℃ 条件下也能够生长，有证据表明甘氨酸和甜菜碱有助于单核细胞增生李斯特菌在低温条件下生长[67]。对于小肠结肠炎耶尔森氏菌来讲情况相同，细胞中由于积累了甘氨酸甜菜碱不仅增强了其耐寒性，而且增强了其耐渗透压的能力[67]。甘氨酸甜菜碱放射性标记显示降温冷冻和增加渗透压会导致甘氨酸甜菜碱的吸收增加 30 倍[80]。

关于用来降低 A_w 的特殊化合物，情况类似于吸附和解析系统（参见第五部分 17）。在最低 A_w 对产气荚膜梭状芽孢杆菌生长和繁殖的研究中，Kang 等人[66]发现用蔗糖和 NaCl 可以将复合培养基的 A_w 调节到 0.97～0.95 之间，如果用甘油则能够将 A_w 调节到更低。另一个研究发现在 A_w 相似的复合培养基中，甘油比 NaCl 更能阻止耐盐细菌，但是不如 NaCl 能够阻止盐敏感菌株[71]。在对芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌发芽的研究中，Jakobsen 和 Murrell 观察到当用 NaCl 和 $CaCl_2$ 控制 A_w 对芽孢发芽具有很强的抑制，如果采用葡萄糖和山梨糖，抑制就少一些；但是使用甘油、乙二醇、乙酰胺或尿素时，抑制就更加轻些。梭状芽孢杆菌在 $A_w=0.95$ 时，芽孢的发芽会被彻底抑制，但是，如果使用尿素、甘油或葡萄糖，即使在相同的 A_w 条件下，芽孢的发芽也不会受到限制。还有一个研究发现，蜡状芽孢杆菌使用葡萄糖、山梨醇、NaCl 时芽孢成熟的极点 A_w 为 0.95，但

是使用甘油极点 A_w 则为 0.91[56]。已经发现：与蔗糖相比，酵母和霉菌都更能够耐甘油[55]。Prior 观察到在葡萄糖限制培养基上生长时，与蔗糖和 NaCl 相比较，甘油能够使荧光极毛杆菌在更低的 A_w 中生长。他们进一步发现葡萄糖、乳酸钠和 DL-精氨酸的分解代谢完全被抑制的 A_w 要比由 NaCl 调节的生长所需的最低 A_w 要大些。用甘油来控制 A_w 使能够在小于生长所需的 A_w 条件下继续进行分解代谢。使用 NaCl 调节 A_w 时，停止底物的分解代谢的 A_w 值要高于其生长所需的最低 A_w；而使用甘油能够使分解代谢在低于其生长所需的最低 A_w 条件下进行。尽管也有相反的报道，但是有一点是很清楚的，就是甘油对微生物呼吸的抑制似乎明显小于蔗糖和 NaCl。

还有一些通过降低 A_w 对微生物进行种属判断的方法。已有报道：有些细菌在低 A_w 时就会积累脯氨酸，并会增加某些“储存”氨基酸的含量，耐盐金黄色葡萄球菌就是如此[15]。Christian [22] 发现：在 A_w 低于 0.97 时，奥兰宁堡沙门氏菌在确定培养基中生长会增加对脯氨酸的需求；Christian 和 Waltho[25]指出：在低 A_w 条件下，脯氨酸能促进呼吸作用。在 10%NaCl 中，虽然谷氨酰胺也得到了合成积累，但是黄色葡萄球菌 MF-31 还能够通过传输来积累脯氨酸 (2)。至于脯氨酸合成的启动，则是随着 A_w 的降低、K^+ 在细胞内的积累以及催化脯氨酸的前体的形成所产生[109]。但是，肠道细菌是不能通过渗透压来促进脯氨酸的合成，而是通过传输从培养基中获取脯氨酸。已经证明：大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌脯氨酸的积累是通过 PP Ⅰ 和 PP Ⅱ 二个传输系统来进行，在渗透压下 PP Ⅱ 的活性会提高[49]。

嗜渗酵母将多元醇的浓度能够积累到与胞外 A_w 相当的水平。根据 Pitt[85]的研究，为了在低 A_w 下能够生长，嗜旱真菌积累合适溶质或渗透压调节剂，所以需要较高的胞内溶质。在对耐旱和不耐旱酵母对水压的比较研究中，Edgley 和 Brown[37]发现：罗氏接合酵母通过保持细胞内不断增加甘油的比例来适应聚乙二醇产生的 A_w 的环境。但是，甘油的量改变不会很大，阿拉伯醇的量也不会很明显改变。另一方面，没有耐性的啤酒酵母通过合成更多的甘油，而不是保持较少的甘油来适应低 A_w 的环境。罗氏接合酵母适应低 A_w 是在甘油渗透/传输水平上，而啤酒酵母则是在代谢水平上。从研究中可知：低 A_w 可以促进啤酒酵母将绝大多数的代谢活性转向甘油的生产，同时增加生长过程中葡萄糖的消耗量。在后面这个研究中，很明显：从外部作用在啤酒酵母、罗氏接合酵母和汉逊德巴利酵母上高达 95% 的渗透压是通过甘油含量的增加来加以平衡[91]，罗氏接合酵母在渗透压下积累更多的甘油，而核糖醇却保持恒定。

鉴于酵母浓缩多元醇作为“渗透压调节剂”和酶的保护剂[14]，嗜盐细菌在低 A_w 条件下以相同方式通过积累 KCl 来进行操作。对于嗜盐细菌，KCl 是它的要求，而耐渗酵母对高溶质浓度有较高的耐性[15]。

众所周知，至少某些细胞在低 A_w 时能大量地生长，而同时不产生胞外的产物，例如，降低 A_w 会造成金黄色葡萄球菌停止产生肠毒素，即使同时有大量细胞增加[120]。对于粗糙链孢霉，低 A_w 造成细胞膜不致死渗透能力的改变，结果损失了若干重要的物质[21]。对电解质和非电解质也有相似的结果。

总而言之，降低 A_w 对微生物营养产生的影响似乎是自然的过程，也就是细胞对水环境的要求是被逐渐终止。除了对营养物的影响外，毫无疑问，低 A_w 对细胞膜的功能会产

生负面影响，细胞膜也必须处于液态之中。将细胞放在一个细胞与底物之间的水处于平衡时的低 A_w 的培养基中，此时细胞内部将发生干燥。虽然其机理尚未完全清楚，所有微生物细胞对细胞内部的 A_w 都有相同的要求。那些在低 A_w 的极端条件下能够生长的微生物是通过其能将盐、多元醇和氨基酸（可能还有其他化合物）浓缩至足够的水平，此时不仅能够防止细胞脱水，而且还能使细胞从水抑制的内部环境中提取出水[24,30,31,70,104,108]。

3.1.3　氧化还原电势

已经知道：许多酵母对其生长的基质的氧化还原电势（O/R，Eh）都表现出不同程度的敏感性[51]。培养基的 O/R 电势通常可以定义为物质失去或得到电子的难易程度。当元素或化合物失去电子时，说明物质被氧化；获得电子就是被还原：

$$Cu \underset{\text{还原}}{\overset{\text{氧化}}{\rightleftharpoons}} Cu^{+} + e$$

正如下列反应方程式所示，加氧也可以氧化：

$$2Cu + O_2 \longrightarrow 2CuO$$

因此，容易放弃电子是一个好的还原剂，容易得到电子的物质就是好的氧化剂。当电子从一个化合物转移到另一个化合物时，两个物质之间就产生了电势差。使用合适的仪器来测量电势差，并用毫伏（mV）表示。如果物质被氧化得越多，它的电势就呈越多的正电；如果物质被还原得越多，就呈越多的负电。当氧化物和还原物的浓度相等，电势就等于零。系统的 O/R 电势可以用 Eh 这个符号来表示。好氧微生物生长时需要正的 Eh（被氧化），而厌氧微生物则需要负的 Eh（被还原）（图 3.3）。食品中有利于维持还原

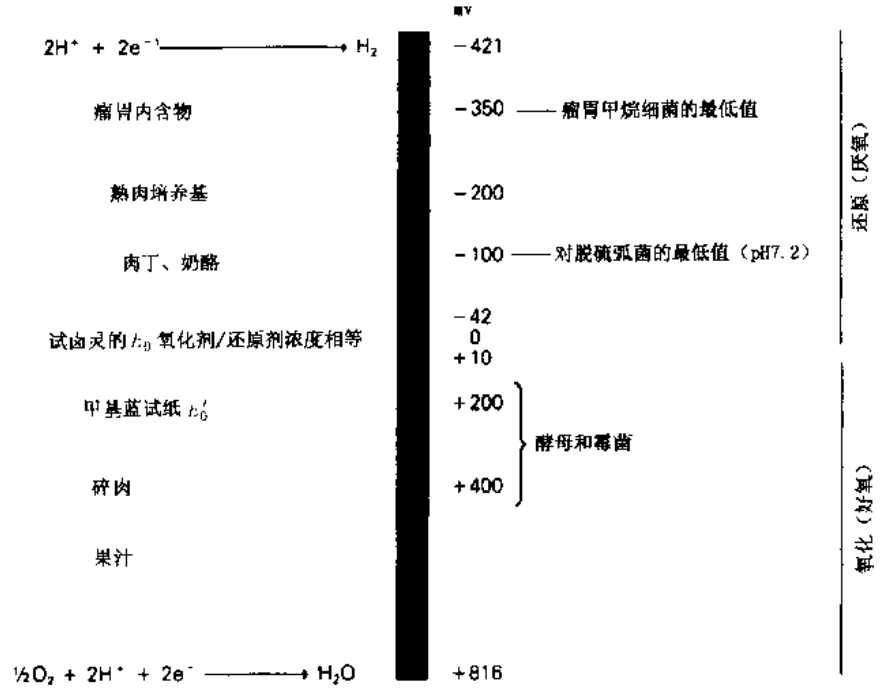


图 3.3　一些微生物生长与氧化还原电势之间关系的图示

条件的物质是肉中的 SH 基团、抗坏血酸、水果与蔬菜中的还原糖。

食品的 O/R 电势可以通过下列方法来确定：

（1）原食物的特征性 O/R 电势

（2）平衡能力，也就是食品中抗电势变化的能力

（3）食品周围环境的氧的压力

（4）大气接触食品的途径

关于微生物对 Eh 的要求，有些细菌在开始生长时要求还原性条件（Eh 值大约为 -200mV），而其他细菌的生长则要求正的 Eh 条件。前面所述的这些细菌都是像梭状芽孢杆菌这样的厌氧细菌，后面的则是像枯草芽孢杆菌这样的细菌。有些好氧细菌实际上在略还原的条件下生长，这些微生物通常被称为微好氧菌。微好氧菌就像乳杆菌和空肠弯曲菌这些菌。还有些无数在好氧或厌氧环境中都可以生长，这样的微生物就被称为兼性厌氧菌。食品中或表面所涉及的大多数霉菌和酵母都是好氧菌，尽管也有一些是兼性厌氧菌。

至于食品的 Eh 值，植物食品，尤其是植物的汁 Eh 值往往为 300～400。毫不惊奇地发现：好氧细菌和霉菌通常是这类食品腐败的原因。大块肉的 Eh 值大约为 +200mV；碎肉的 Eh 大约是 200mV。已经发现各种奶酪的 Eh 为负值，大约在 −20～−200mV 左右。

关于僵硬前肌肉的 Eh 值与僵硬后相反的情况，Barnes 和 Ingram 对屠宰后 30h 里脊肉的 Eh 值以及 Eh 值对厌氧细菌生长的影响进行了一个测量研究，他们发现：马的 sternocephalicus 肌肉的 Eh 值在刚死亡时为 250mV，此时梭状芽孢杆菌不能生长。屠宰后 30h，在没有细菌生长条件下 Eh 降到 −130mV；当细菌开始生长时，Eh 已降至 −250mV。梭状芽孢杆菌的生长是在 Eh 为 -36mV 以下。这些研究者进一步在鲸肉上证实了在马肉上的发现：厌氧细菌在肌肉开始僵直时才进行繁殖，因为僵硬之前肉的 Eh 值较高。毫无疑问：对牛肉、猪肉和其他类似的肉来讲，情况也是如此。

Eh 的影响：微生物在生长过程中对环境 Eh 的影响就像对 pH 的影响一样，尤其是好氧菌更是如此，好氧菌能够降低环境的 Eh，而厌氧菌则不行。好氧菌生长的时候，培养基中的 O_2 逐渐耗净，结果 Eh 就降低了。但是，由于细胞能够利用培养基中提供氧和接受氢的物质，因此其生长并没有像预想的那样慢下来。结果造成培养基中氧化性物质减少、而还原性物质增加[75]。培养基的 Eh 能够被微生物产生的某些代谢副产物所还原，例如 H_2S，它能够将 Eh 降至 −300mV。因为 H_2S 很容易与 O_2 反应，并且很容易在厌氧环境中积累。

Eh 值的大小取决于物质的 pH，pH 和 Eh 二者之间直接的关系取决于 rH，如下：

$$Eh = 2.303\frac{RT}{F}(rH - 2pH)$$

这里 $R=8.315J$，$F=96500C$，T 为热力学温度[76]。Eh 给定后，pH 就能够确定，pH7.0 时的 Eh 一般都用 Eh′来表示。在 pH7.0 和 25℃，所有的浓度都为 1.0mol/L 的条件下，Eh＝Eh′，（简化的 Nernst 公式）。实际上，在逐渐为碱性的环境中，Eh 趋于负值。

在自身的营养物中，植物和水果中的抗坏血酸和还原糖以及肉食中的 SH 基团是最为主要和重要的营养成分。培养基中适量的氧化-还原剂的存在与否，对所有微生物的生

长和活性是十分重要的。

虽然通常认为好氧菌生长在还原性的 Eh 中，但是逐出氧对有些好氧菌也是必要的。产气荚膜梭状芽孢杆菌、*Bacteroides fragilis* 和 *Peptococcus magnus* 在有 O_2 存在的条件下，当培养基的 Eh 处于 −50mV 时会出现抑制其生长的情况[111]。研究还发现：在缺氧条件下 Eh 高达 325mV 时这些菌也能够生长。

至于 Eh 对啤酒酵母脂质产生的影响，研究已经表明：厌氧生长的细胞与好氧生长的细胞相比，产生较低量的总脂质、较多量的各种甘油酯以及较低量的磷酸脂和甾醇组分[38]。厌氧生长的细胞产生的脂质的特点是 8∶0 和 14∶0 的脂肪酸含量较高（可以达到总酸量的 50%）以及磷脂组分中不饱和脂肪酸含量较低；对好氧生长的细胞来讲，80%～90%的脂肪酸是以甘油酯结合的形式存在，磷脂中是 16∶1 和 18∶1 的不饱和脂肪酸。研究发现：与厌氧生长的菌所不同的是，厌氧生长的啤酒酵母需要脂质和甾醇。关于 Eh 的详细情况可以参见参考资料 17。

3.1.4 营养成分

为了能够生长和达到一般的作用，食品中的微生物需要如下的营养成分：

（1）水分

（2）能源

（3）氮源

（4）维生素及相关的生长因子

（5）矿物质

水对微生物的生长和生命活动的重要性在本章开始的时候就提及了，对于其他四类物质，霉菌对它们的要求最低，其次是酵母、革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌。

食品传播的微生物能够利用糖、醇和氨基酸作为能源。还有少数微生物可以利用像淀粉和纤维素这样的复杂碳水化合物，通过首先将它们降解成单糖以后作为能源。脂肪也可以被微生物用作能源，但是脂肪只能被相当少数的食品微生物所利用。异养微生物的主要氮源是氨基酸，还有大量的其他含氮化合物能够作为各种微生物的氮源。例如有些微生物能够利用核苷酸和自由氨基酸，而其他的微生物则可以利用多肽和蛋白质。一般来讲，几乎所有的微生物在利用像高分子蛋白质这样比较复杂的化合物之前，都会首先采用像氨基酸这样的简单化合物作为氮源。微生物对于多糖和脂肪的利用情况也是如此。

微生物只需要少量的维生素 B，几乎所有天然食品往往都含有足够量的维生素 B 来满足那些不能自身合成基本需要量的微生物。一般来讲，革兰氏阳性菌的合成能力最差，在生长前必须利用 1～2 种这样的化合物。革兰氏阴性菌和霉菌可合成并满足自身所需的所有或大多数的化合物。因此，发现这两种微生物可在维生素 B 含量低的食品中生长。水果的维生素 B 的含量往往较低，加上水果的低 pH 和正的 Eh，这些都有助于解释为什么这些食品通常都是霉菌腐败而不是细菌腐败的原因。

3.1.5 抗微生物成分

对微生物的侵染有些食品表现得非常稳定，这是因为其中存在着某些天然的具有抗

菌能力的物质。已知有些种的微生物拥有重要的具有抗菌能力的油。这些抗微生物物质包括丁香中的丁子香酚、大蒜中的蒜素、肉桂中的肉桂醛和丁子香酚、芥菜中的芥子油（异硫氰酸烯丙酯）、藿香中的丁子香酚和麝香草酚以及欧洲牛至中的香芹酚（异丁子香酚）和丁子香酚[100]。牛乳中含有多种抗微生物物质，包括乳铁蛋白、共凝集素、乳过氧化酶系统（见下述）。已经报道鲜奶含有旋转病毒的抑制剂，它能够抑制 106pfu（形成的噬菌斑单位）/mL。通过巴斯德灭菌可以杀死该病毒。据研究报道，在某些条件下乳酪蛋白也有抗菌作用。

鸡蛋中含有溶菌酶，就像在乳中一样，溶菌酶与伴清蛋白一起可以赋予鸡蛋相当有效的抗菌系统。水果、蔬菜、茶、糖蜜和其他植物中的羟基肉桂酸的衍生物（*p*-香豆酸、阿魏酸、咖啡酸和绿原酸）具有抗细菌和抗霉菌的作用。

十字花科（大白菜、抱子甘蓝、茎椰菜、芜菁等等）植物的细胞液泡含有硫代葡萄糖苷。在创伤和机械损伤处，硫代葡萄糖苷能够产生异硫氰酸盐。有关抗食品微生物的情况可以参考第五部分 13。

乳过氧化酶系统：乳过氧化酶系统是牛乳中天然产生的一种抑制系统。乳过氧化酶系统由三部分所组成：乳过氧化酶、硫氰酸和过氧化氢，三部分组成都要有抗微生物的作用。革兰氏阴性嗜冷菌，例如假单胞菌对乳过氧化酶系统是相当敏感。抗菌所需的乳过氧化酶的量为 0.5～1.0μL/L，而牛乳中通常含有 30μL/L[9]。虽然牛乳中一般含有硫氰酸和过氧化氢，但是数量却不稳定。至于过氧化氢，在抑制系统中大约需要 100U/mL 的过氧化氢，而牛乳通常只有含有 1～2U/mL。硫氰酸有效的含量大约是 0.25mmol/L，但牛乳中硫氰酸的含量是在 0.02～0.25mmol/L 之间[9]。

当将硫氰酸加到 0.25mmol/L 浓度，同时加入等量的过氧化氢时，鲜乳中的乳过氧化酶系统就被激活了，贮藏期可以从 48h 的对照中延长到 5d。乳过氧化酶系统在 30℃条件下比 4℃条件下更加有效力。对细菌的作用效果会随着酸性而增强，细胞质膜似乎是作用的目标。除了直接加入过氧化氢以外，可以通过加入葡萄糖和葡萄糖氧化酶来提供外源过氧化氢。为了避免直接加入葡萄糖氧化酶，已经成功地将葡萄糖氧化酶固定在玻璃珠上，这样可以通过固定化 *β*-半乳糖苷酶按照反应所需的量来生成葡萄糖[10]。乳过氧化酶系统在羊乳中对荧光极毛杆菌和大肠杆菌的作用非常有效，在 8℃条件下可以对荧光极毛杆菌控制 3d，对大肠杆菌控制 2d[114]。

在冰箱尚未普及的国家中，乳过氧化酶系统能够用来保藏鲜乳。加入大约 12μL/L 的 SCN^- 和 8μL/L 的过氧化氢对牛乳的消费者来讲不会有害[92]。乳过氧化酶系统有趣的一个方面是它对热力学性质的影响。在某项研究中发现：在 57.8℃条件下能够将单核细胞增生李斯特菌的热力学 *D* 值降低了 80%；在 55.2℃条件下将金黄色葡萄球菌的热力学 *D* 值降低了 86%[62]。虽然对提高热破坏能力的机理尚不清楚，但是可以对其有趣的含义进行展望。有关乳过氧化酶系统详细的情况可以参见参考资料 69 和 92。

3.1.6 生物结构

有些食品自身的外层结构能赋予食品在对付腐败微生物的侵染以及破坏中起到极好的抵抗作用。这些生物结构包括种子的种皮、水果的外皮、坚果的壳、动物的皮毛以及

鸡蛋的壳。对于像美洲山核桃和胡桃这样的坚果，它们的壳或外层结构足够抵御所有微生物的侵染。当然，一旦外壳破碎，坚果肉就会受到霉菌的侵染。如果鸡蛋的外壳和鸡蛋的膜完好无损，在合适的温度和湿度条件下贮藏时能够防止几乎所有的微生物的侵染。与外层未受损坏的水果相比，外层损坏了的水果和蔬菜就会较快地遭受微生物的腐败。牛肉和猪肉的皮层能够阻止这些食物遭受侵染，部分原因是由于皮层比新鲜的切口表面干燥得更快。

这 6 个内在因素结合在一起相当于是防止动、植物受到微生物侵染的自然途径或方法。通过检测每个因素在食品中的实际情况，人们可以预测可能生长的微生物的一般类型，也能预测这个食品的整个稳定性。这些检测还可以辅以检测食品的龄期及其生产过程。

3.2　外在因素

食品的外在因素是影响食品以及微生物的贮藏环境的一些参数。对食品传播的微生物产生最重要影响的一些因素如下：

（1）贮藏的温度

（2）环境的相对湿度

（3）环境中的气体以及其浓度

（4）其他微生物的存在及其活性

3.2.1　贮藏的温度

不论是微生物个体还是某类微生物可以在很广的温度范围内生长，因此，以食品中重要的微生物生长的温度范围作为选择不同食品适宜的贮藏温度的主要依据，这是十分有益的（参见图 3.4）。

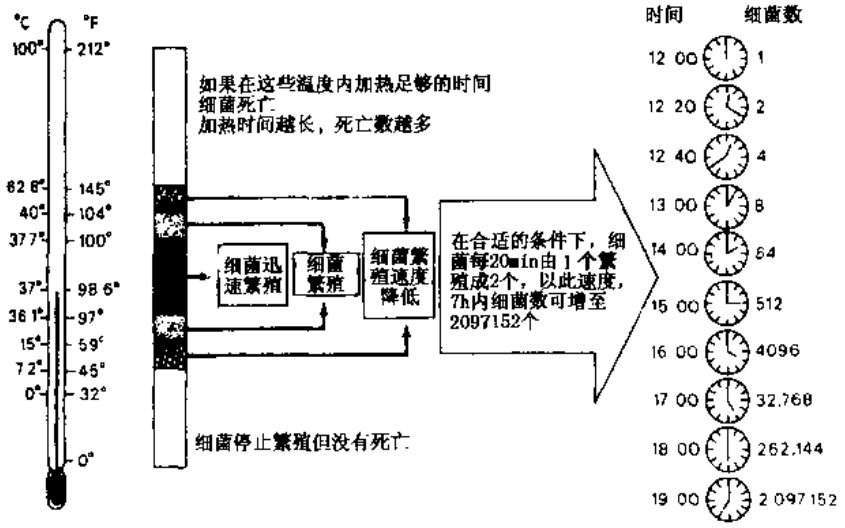


图 3.4　温度和时间对细菌生长的影响、食物安全与危险的温度

根据报道，微生物生长的最低温度为－34℃，最高有时超过 110℃。通常习惯根据微生物生长对温度的要求将微生物分成三大类。在 7℃或 7℃以下能够很好地生长、最适生长温度在 20℃至 30℃之间的微生物称为嗜冷微生物（参见第五部分 15）；在 20℃至 45℃条件下能够很好生长、最适温度在 30℃至 40℃之间的微生物称为嗜温微生物；而在 45℃或 45℃以上能够生长、最适温度在 55℃至 65℃之间的微生物称为嗜热微生物（这三类微生物的生理特性将在第五部分 15 和 16 中论述）。

关于细菌，嗜冷微生物菌种以及菌株发现在如下的种属里：产碱杆菌属、希瓦氏菌（*Shewanella*）、索丝菌（*Brochothrix*）、梭状芽孢杆菌属、黄杆菌属、乳杆菌属、微球菌属、假单胞菌属、嗜冷杆菌属、粪链球菌属等等。食品中最常发现的嗜冷菌是属于假单胞菌属和粪链球菌属（见第五部分 15）。这些嗜冷微生物在冰箱的温度下能够很好地生长，并造成肉食、鱼、家禽、鸡蛋和其他通常在此温度下进行保存的食品的腐败。对这些食品进行检测，在 7℃条件下至少培养 7d，标准平板上的可见微生物的数量要高于在 30℃以及 30℃以上条件下培养的结果。嗜温微生物菌种以及菌株在第二部分 2 中提及过，在冰箱温度下保存的食品中能够找到。这些微生物在冰箱温度下不能生长，但是如果其他条件合适的话，在嗜温范围内是可以生长。必须指出的是：有些微生物在 0℃至 30℃或 30℃以上的温度范围中生长。粪链球菌就是这样的微生物。

食品中大多数重要的嗜热细菌属于芽孢杆菌属和梭状芽孢杆菌属。虽然在这些属中只有一些菌种是嗜温的，但是罐头工业的食品微生物学家和食品工艺技术人员对这些菌具有极大的兴趣。

正如霉菌能够在较广的 pH、渗透压和营养物条件下生长一样，霉菌生长的温度范围也比细菌要广一些。许多霉菌能够在冰箱温度下生长，众所周知的有：米曲霉、芽枝霉、枝霉，在鸡蛋、牛肉的内部以及水果中都能够发现它们。酵母可以在嗜冷以及嗜温的温度条件下，但是不能在嗜热环境中生长。

在选择贮存温度时，必须考虑食品的质量。虽然将所有的食品储存在冰箱温度或更低的温度下感觉似乎是比较理想的，但是对于保持某些食品的理想的质量来讲，该方法并不总是最好的。例如，将香蕉储存在 13～17℃条件下要比在 5～7℃条件下效果要好些。许多蔬菜也适宜在 10℃条件下保存，其中包括土豆、芹菜、大白菜和许多其他的蔬菜。在任何情况下，成功地进行贮存的温度在很大程度上取决于贮藏环境的 R.H 值以及像 CO_2 和 O_2 这样的气体存在与否。

贮藏温度是影响易腐烂食品腐败最重要的因素，Olley 和 Ratkowsky 等人已经在他们的研究中强调过这一事实。根据他们的研究，腐败可以通过腐败速率曲线加以预测[178]。腐败速率曲线已经整和到温度功能集成器的程序中，温度功能集成器能够读出在 0℃条件下贮藏的天数，这样就有可能预测 0℃条件下食品的保存期。研究已经表明：在 10℃条件下新鲜的家禽腐败的速率是 5℃条件下的两倍，15℃条件下腐败的速率是 5℃条件下的三倍[35]。替代 Arrhenius 公式，下列公式经过改进用来描述最低与最适温度与微生物的生长速率之间的关系[88]：

$$\sqrt{r}=b\ (T-T_0)$$

上式 r 是生长速率，b 是回归线的斜率，T_0 是无代谢意义的概念温度。已经表明这个

线性关系可以用来表示腐败细菌和霉菌在食品中生长或利用氨基酸的情况[88]。将数据带入这个公式中，能够预测食品中微生物的生长状况，这些将在第三部分 8 中详细讨论。

3.2.2 环境的相对湿度

贮藏环境的 R.H 值对食品的 A_w 和食品表面微生物的生长非常重要。当食品的 A_w 达到 0.60 时，重要的是食品应该贮藏在不能让食品从空气中吸取水分的 R.H 值条件下，否则食品自身表面和表面下 A_w 值就会增加，微生物就能够生长。当把低 A_w 值的食品放置在高 R.H 值的环境中时，食品就会吸收水分直到建立起平衡为止。同样，高 R.H 值的食品在低 A_w 值的环境中时就会失去水分。在选择合适的贮藏条件时应该牢记 R.H 值和温度之间的关系。总的来讲，温度越高，R.H 值就越低，反之也是如此。

表面遭受霉菌、酵母和某些细菌腐败的食品应该在低 R.H 值条件下进行贮藏，包装不好的肉在冰箱中往往在深度腐烂前容易遭到许多表面腐败，如全鸡和牛肉块，这是因为冰箱的高 R.H 值以及肉中腐败的生物群是具有好氧的特性的微生物。虽然通过贮藏在低 R.H 值条件下可能会减少表面腐败的机会，但是应该记住，在此条件下食品自身将会失去水分而造成自身品质变差。因此，在选择合适的 R.H 值环境时，应该同时考虑微生物在食品表面生长以及保持理想的食品品质两个问题。通过改变贮藏的气相组分，可以在不降低 R.H 值的同时阻止表面腐败。

3.2.3 环境中的气体及其浓度

在含有增加 CO_2 浓度达 10%的气体中贮藏食品就称为“可控气体”贮藏或气调（MA）贮藏。气调（MA）贮藏对植物组织的影响早在 1917 年就众所周知，在 1928 年首次进入工业化使用。在许多国家对水果都是采用气调（MA）贮藏，气调（MA）贮藏是苹果和梨最常用的贮藏方法。CO_2 浓度通常不超过 10%，使用的 CO_2 是通过机械搅拌加入或者就是使用干冰（固体 CO_2）。已经证明二氧化碳能够阻止由各种各样真菌引起的水果的真菌腐烂。虽然 CO_2 阻止水果腐败的确切机理尚不清楚，可能是作为乙烯作用的竞争性抑制剂。乙烯可能是作为水果的衰老因子[67]，CO_2 的抑制具有维持水果保持较好的抵御真菌侵袭的天然的抵抗能力。

在食品的贮藏环境中加入臭氧对某些食品能够起到贮藏作用，人们对这一作用的认识已经有许多年了。使用百万分之几的 CO_2 来处理某些食品后发现：用于对付腐败微生物非常有效，并且对付各种各样的微生物都有效[19]。由于 CO_2 是很强的氧化剂，因此不能用在高脂含量的食品的贮藏中，因为它会加速酸败。在长期贮藏时，CO_2 和 O_2 能够有效地阻止牛肉块表面的腐败。

CO_2 和 O_2 的影响：使用 CO_2 来延长肉食的贮藏期早在 20 世纪 80 年代就受到了广泛的关注。30 年代时，在船运肉胴体的贮藏柜中就充满了 CO_2 作为延长贮藏期的手段[46,98]。随着肉的真空包装的应用的增多，对这方面的实践也产生了许多新的兴趣。许多研究者都发现高压 CO_2 延长了肉制品的货架期，还有些发现都列在下面。Daniel[34]和 Genigeorgis [46]，Dixon 和 Kell[45]回顾了这方面的工作。关于真空包装的详细情况参见第三部分 5。

一般来讲，CO_2 的抑制作用随着温度的降低而增加，这主要是由于在低温条件下 CO_2 的溶解性增加了的缘故；贮藏在高 CO_2 的环境中，由于形成了碳酸，肉的 pH 往往要比在空气中贮藏略为低一些。革兰氏阴性菌对 CO_2 要比革兰氏阳性菌更加敏感[104,106]，其中假单胞菌最为敏感，而乳酸菌和厌氧菌则最具有抗性。

与贮藏在 100%的 N_2 或 100%的 O_2 或空气中的牛排相比，贮藏在 100%的 CO_2 中的屠宰后 16～27d 的牛排中的微生物的数量明显较低。1℃条件下，在 15%的 CO_2 和 85%的空气或 15% CO_2 和 85%的 O_2 中贮藏 20d 的牛排中的微生物数量，比贮藏在空气中的牛排还是要少（约为三分之一）[3]。CO_2+O_2 的混合气体要比 CO_2+空气的混合气体效果要好。与贮藏在空气中相比，当羊排贮藏在 80% O_2+20%N_2、或 80%空气/O_2+20% CO_2、或 80%N_2/H_2+20%CO_2 的－1℃条件下，嗜冷微生物的数量逐渐降低[77]。将接入了假单胞菌、莫拉氏菌和不动杆菌（*Moraxella-Acinetobacter spp*）的瘦牛肉片在 70%～85%+15% CO_2 的 5℃条件下贮藏，与在空气中贮藏相比，其贮藏期延长了 9d[27]。在对贮藏于 4℃或 14℃的猪肉的研究中看到：4℃条件下好氧微生物的平板计数（APC）达到 5×10^6 个/cm^2 的时间是贮藏在 0.5MPa CO_2 条件下的 3 倍，是空气中的 15 倍[1]。将家禽贮藏在空气中，10℃条件下 16d 以后，解冻滴汁的 APC 是 lg9.40，而在 20%CO_2 中贮藏，lg APC 为 6.14[110]。在其后的研究中，CO_2 在阻止大肠杆菌上效率要弱些，在空气和 20% CO_2 中贮藏时其对数值分别为 3.28 和 3.21。新鲜鸡块在 60%～80%CO_2 包装以及 2℃条件下贮藏的贮藏期至少可以延长到 35d[56]。

研究发现：在保存无隔绝膜的牛排时，由 10% CO_2、5%O_2、85%N_2 组成的混合气体比其他两种混合气体更加有效[71]。其他所用的混合气体是 15%CO_2，40%O_2，45%N_2；60%CO_2 和 40%O_2。研究中没有发现乳酸菌，却发现了 *B. Thermosphacta*，但它不是主要的微生物。在各种处理中，液化沙雷氏菌（*Serratia liquefaciens*）的数量增加了。发现将 20%CO_2 与 80%N_2 混合起来，其对新鲜肉的效果并不比真空处理的效果差[109]。4℃条件下贮藏在 50%CO_2 和 50%空气中的肉三明治能够较好地保存到 35d，其中烤牛肉的三明治（28～35d）比汉堡（14d）贮藏的时间更长[74]。薄膜的传递特性为：12.1mL O_2/(m^2·d)（23℃）。用 CO_2 处理鲜乳的研究表明：在 7℃条件下贮藏，假单胞菌数倍增的时间延长了[93]，用 CO_2 处理后其 APC 增加 10 倍的时间延长了 24h。

CO_2 气调贮藏对鱼类非常有效，用 80%CO_2+空气，35℃条件下 14d 以后的对数值大约为 6.00/cm^2，而用空气作对照的对数大于 10.5/cm^2。14d 以后用 CO_2 贮藏的产品的 pH 为 6.30～6.75，而对照的 pH 则增加到 7.45[18]。4℃条件下大麻哈鱼的贮藏期在 20%～80%条件下延长了[18]；鲟鱼和黄花鱼在 4℃条件下 CO_2 中贮藏时可以观察到细菌数与对照组相比至少有 1 个对数值的差距[50]；当新鲜的大虾或小虾包装在有 100%CO_2 气体的冰中，两周以后仍然能够食用，14d 以后的细菌数低于空气包装 7d 后的产品[72]；当鳕鱼片储藏在 2℃条件下，空气处理的样品 6d 就腐烂了，APC 为 lg7.7，而存储在 50%CO_2+50%O_2 或 50%CO_2+50%N_2 或 100%CO_2 条件下直到 26d、34d 和 34d 才出现腐败，APC 分别为 7.2、6.6 和 5.5/g[105]。研究指出：从技术上讲，使用 50%CO_2+50%O_2 要比单独使用 100%CO_2 要容易。尽管对鲜肉使用 CO_2 的上限浓度仅为 20%左右，但是对于鱼类却可以使用更高的 CO_2 浓度，因为鱼类含有的肌红蛋白的量较低。

高浓度的CO_2对包装肉的综合作用是改变了其中的生物群，生物群由革兰氏阴性菌变为以乳酸杆菌和其它乳酸菌为主要组成的异源菌。在 Blickstad 等人[11]的研究，4℃条件下好氧贮藏 8d 或 14℃贮藏 3d 后，猪肉中的生物群主要是假单胞菌；但是在 0.5MPa 的CO_2中贮藏后，在这两个温度下乳酸杆菌成为了主要的微生物。从表 3.6 中能够观察出这种作用，其中熏猪腰肉和法兰克福小香肠在 4℃条件下，在 100%CO_2，100%N_2和真空下保存 48～140d，尽管猪腰肉的 pH 没有降低，但是在CO_2和真空中贮藏的法兰克福小香肠的 pH 却降低了，这就是乳酸杆菌作用的结果。这两个产品的贮藏期依次增加：真空＜N_2＜CO_2[12]。许多研究者发现鲜肉的贮藏期按照N_2＜真空＜CO_2这个顺序增加。在另一个研究中也发现：低 pH 牛肉的初始微生物群是 13%荧光假单胞菌和 87%没有荧光的假单胞菌。4℃条件下真空保藏了 21d 以后，96%的微生物群为同型发酵的乳酸菌，而在 100%CO_2条件下贮藏 51d 后，100%的微生物群都是同型发酵的乳酸菌类[14]。还有一个研究是与空气贮藏的对照组相比较，将贮藏在 20%CO_2＋80%空气中的高 pH 肉片进行培养，在 3℃条件下肠杆菌和热杀索丝菌（Brochothrix thermosphacta）菌都没有受到影响[47]。

表 3.6　　在 4℃条件下 48～140d 贮藏对两种肉食微生物菌群的影响[12]

	熏猪腰肉			
	0d	真空 48d	CO_2 48d	N_2 48d
lgAPC/g	2.5	7.6	6.9	7.2
pH	5.8	5.8	5.9	5.9
主要菌群/%	黄杆菌（20）	乳杆菌（52）[a]		
	节杆菌（20）		乳杆菌（74）[b]	
	酵母（20）			乳杆菌（67）[c]
	假单胞菌（11）			
	棒杆菌（10）			
	法兰克福小香肠			
	0d	真空 98d	CO_2 140d	N_2 140d
lgAPC/g	1.7	9.0	2.4	4.8
pH	5.9	5.4	5.6	5.9
主要菌群/%	芽孢杆菌（34）	乳杆菌（38）	乳杆菌（88）[d]	乳杆菌（88）[e]
	棒杆菌（34）			
	黄杆菌（8）			
	索丝菌（8）			

注：（1）菌群数量由绿色乳杆菌表示；[a]40；[b]72；[c]50；[d]22；[e]35。

（2）资料来源：参考资料 12。

至于微生物对CO_2抑制的相对敏感程度，核盘菌（*Sclerotium rolfsii*）真菌受到 0.122×10^5Pa CO_2的抑制，而 *cremoris* 乳杆菌则需要 1.1MPa CO_2[39]。变形杆菌和微球菌不如

假单胞菌对 CO_2，但是也不如 *cremoris* 乳杆菌能够耐 CO_2 的抑制。在 CO_2 对低 pH 的牛肉的生物群影响的研究中，Erichsen 和 Molin 发现微生物对 CO_2 的耐受性按照下列顺序：假单胞菌＜*B. thermosphacta*＜乳酸细菌。在 100%CO_2 中贮藏的肉贮藏期最长，其次为真空贮藏。使莓实假单胞菌（P. fragi）比对照组生长速率降低 50% 的 CO_2 压力为 50kPa；蜡状芽孢杆菌为 132kPa；*cremoris* 乳杆菌则为 60kPa[39]。有研究者发现：对付莓实假单胞菌、金黄色葡萄球菌、*typhimurium* 葡萄球菌、产气荚膜杆菌（*C. Perfringens*），最有效、最安全的混合气体是 75%CO_2+15%N_2+10%O_2[52]。

至于 CO_2 抑制微生物的机理，目前有两种解释。King 和 Nagel[64]提出 CO_2 阻碍了铜绿色假单胞菌的新陈代谢，影响了微生物群体的酶法脱羧；Sears 和 Eisenberg[97]发现 CO_2 影响了细胞膜的通透性；Enfors 和 Molin[38]在研究了生孢梭状芽孢杆菌（*C. sporogenes*）的芽孢和产气梭状芽孢杆菌的内生孢子的发芽后支持后一种假设。在 0.1MPa CO_2 压力下，这两种细菌芽孢的发芽受到刺激，而蜡状芽孢杆菌芽孢的发芽则受到抑制。正如在其他情况下一样，CO_2 在低 pH 条件下比高 pH 时更具有刺激性，在 5.5MPa CO_2 压力下，只有 4% 生孢梭状芽孢杆菌的芽孢发芽，但产气梭状芽孢杆菌在 5.5MPa CO_2 压力下其发芽率将减少到 4%[38]。这些作者提出 CO_2 的抑制是由于 CO_2 积累在磷脂双层膜中，结果增加了液体流动性。在早期研究中，产气梭状芽孢杆菌的 8 株菌株在 100%CO_2 和 100%N_2、0.1MPa 条件下，在巯基醋酸盐培养基中的倍增时间基本相同，分别为 12.9～17.2 和 12.9～16.9[79]。在基本培养基中，压力在 1.3kPa 的 CO_2 刺激荧光假单胞菌的生长，但是 CO_2 压力更高时，荧光假单胞菌生长速率就下降[47]。在 30℃条件下的复合培养基中，荧光假单胞菌在 CO_2 达到 33.3kPa 时受到最大的抑制。包括 Enfors 和 Molin[40]的这些研究者发现：随着温度的升高，CO_2 的抑制逐渐降低。虽然人们知道 CO_2 是某些微生物的抑制剂已经有 100 多年的历史，但是目前还不清楚它是如何产生这样的抑制的[36]。

由于需要极端高压的 CO_2 来抑制 *sporogens* 和产气荚膜梭状芽孢杆菌芽孢的发芽，在肉毒梭状芽孢杆菌生长温度和 0.1MPa CO_2 条件下贮藏肉食，令人担忧可能会出现肉毒梭状芽孢杆菌芽孢发芽。用 CO_2 覆盖的培养基能够增强肉毒梭状芽孢杆菌 A 和 B 型芽孢的发芽[44]。将猪腰肉与肉毒梭状芽孢杆菌的芽孢在一起培养，贮存在 15%～75%CO_2 中，并进行低剂量的辐射（达 1.0kGy）后，在 15%～30%CO_2 条件下会迅速产生毒素，而保持在 45%～75%CO_2 下的猪腰肉，毒素的产生就被推迟了[68]。在 15℃条件下培养，猪腰肉可以保持到 42d。

研究表明：在 35℃下的蒸馏水中，对单核细胞增生李斯特菌用 CO_2 高压处理（6.1MPa）2h，这对单核细胞增生李斯特菌是致死性处理，但是，在同样条件下，如果用 N_2 取代 CO_2，就不会对单核细胞增生李斯特菌产生致死作用[112]。对于某些食品，如果用 13.6×10^6Pa 的 CO_2 在 35℃条件下对沙门氏菌和李斯特菌处理 2h，可以观察到致死率能够达到 95%～100%[112]。

3.2.4 其他微生物及其活性

有些食品传播的微生物会产生对其他微生物有抑制或致死作用的物质：这些物质包

括抗生素、杀细菌素、过氧化氢和有机酸。杀细菌素将在乳酸拮抗作用中讨论，有些抗生素也将在第五部分 13 中讨论。食品生物群对其他微生物的抑制作用已很好地证实了，这将在微生物的一般干涉中进行讨论。

3.2.4.1 微生物的一般干涉

微生物的一般干涉这种现象，就是在同一环境或栖息地中其他微生物对某种微生物产生的一般性的、非特异的抑制或毁坏。鉴于乳酸拮抗作用是微生物干涉中的特例，将有些不好定义的抑制方式概括如下。

"细菌干涉"是由 R. Dubos 用来描述这一领域早期研究所提出的，它主要涉及人类病原菌受到皮肤一般生物群的拮抗作用。更加特殊的是，许多医学研究者在 20 世纪 60 和 70 年代发现一般鼻孔中的无害的葡萄球菌菌群通过更为强烈的葡萄球菌来防止其他微生物的群居。这已通过给新生婴儿鼻孔喷洒或接种活的无害菌株进一步得到了证实，无害菌株防止随后的强烈的菌株的栖息[102]。对这个领域早期的工作的回顾可以参考参考资料 102。

对细菌干涉进行经典回顾的是 Howard Florey[43]，他将微生物干涉的例子追溯到 1877 年的 Pasteur 和 Joubert。在 20 世纪 60 年代以前，这些工作大多数都是由医学研究者进行，但是到了 20 世纪 60 年代以后，食品微生物学家对此产生了兴趣。

对食品中微生物干涉最早进行研究是 Dack 和 Lippitz[32]，他观察到冷冻饼上自然的微生物群抑制了接种接入的金黄色葡萄球菌、大肠杆菌和 *typhimurium* 葡萄球菌。Peterson 等人发现：饼上的金黄色葡萄球菌受到大约 10^5/g 的自然微生物菌群的抑制[84]；Goepfert 和 Kim[48]指出食品传播的病原菌在自身微生物群为 10^5/g 的新鲜碎牛肉上不能生长。较近的研究已经表明了食品生物群对 *monocytogenes* 菌和病原菌大肠杆菌的一般拮抗活性。已经很好地证实了足够多的好氧细菌群对鲜肉中肉毒梭状芽孢杆菌的抑制作用，就好像新鲜碎肉中的细菌群对酵母和霉菌的抑制一样。

乳酸拮抗作用、杀细菌素、pH 的抑制、有机酸、过氧化氢、双乙酰以及其他物质产生对病原菌和食品腐败菌的抑制。对一般微生物干涉的机理还不清楚。首先，自身微生物菌群的可见细胞数需要大大多于被抑制的微生物；其次，干涉菌群通常不是同源微生物。其中特殊菌种所起的作用还不清楚，对干涉的解释有：①对营养物的竞争；②吸附或附着位点的竞争；③提供不良环境；④这几个因素的综合[40]。

3.2.4.2 乳酸的拮抗作用

发现在混合培养中乳酸细菌能够抑制或杀死与其相近的食品中毒和食品腐败的微生物的现象已经有 70 年以上的历史，对通常所称的乳酸拮抗作用的准确机理也不清楚。验证过的因素包括：抗生素、过氧化氢、pH 的抑制、双乙酰、营养物匮乏以及杀细菌素或与杀细菌素类似的因素。在乳酸细菌产生的杀细菌素中，乳酸球菌肽是最为有名和研究较多的，乳酸球菌肽将在第五部分 13 抗生素中讨论。虽然对杀细菌素的活性似乎相当地易懂，但是这些物质无法解释观察到的乳酸拮抗作用，尤其是对革兰氏阴性菌的抑制作用。

费氏丙酸杆菌（*P. Freudenreichiii*）的亚种谢氏丙酸杆菌（*P. shermanii*）在巴氏杀菌过的脱脂牛乳培养过程中能够产生一种无法定义的多组分抑制系统，这个系统在对酪农干酪的革兰氏阴性菌非常有效。Microgard™就是这样一个产品。Reuterin（3-羟基丙醛）

是由路氏乳杆菌（*L. reuteri*）产生的具有广谱抗细菌活性的物质。

Holzapfel 等人[54]将能够加入到食品中产生保护作用的微生物称之为保护菌，以上两种菌就符合这一特征。保护菌应该具有的特性有：①不会危害健康；②赋予产品有益的作用；③对感官特性不会产生负面影响；④在不良条件下可以作为“指示剂”[54]。乳酸细菌组成了这一部分内容中最多和最重要的部分。

在已知的乳酸细菌中能够产生杀细菌素的菌株多种多样，在对 280 株乳酸球菌的研究中发现大约 5% 的菌株要么可以产生杀细菌素，或者能够产生类似杀细菌素的因子[145]。在有篇列举了近 40 种杀细菌素的报道中，乳杆菌能够产生最多的杀细菌素，其次为乳球菌[76]。有关发现新的菌种和菌株的报道不断出现。虽然早期的注意力只是集中在乳品中的乳酸菌，从肉和其他非乳品的发酵产品中也能够发现新的菌种和菌株。图 3.5 所示为啤酒足球菌和胚芽乳杆菌对金黄色葡萄球菌的抑制作用。

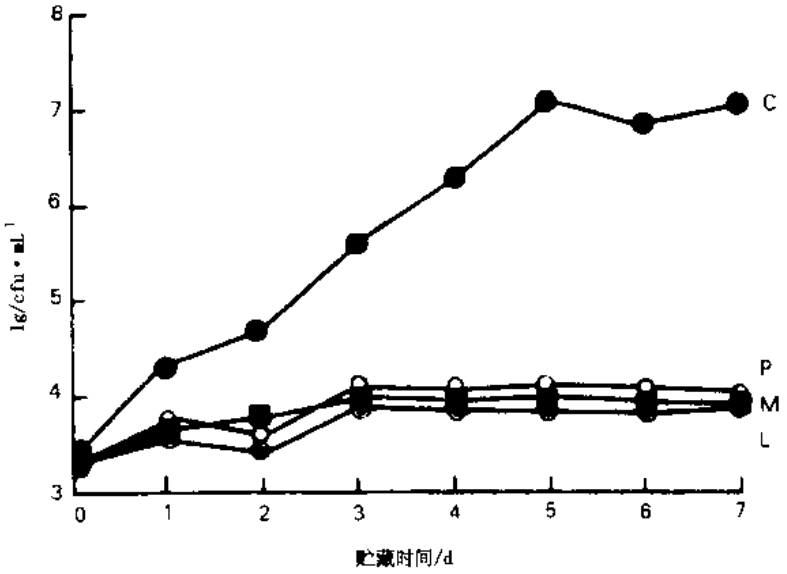


图 3.5 15℃条件下煮熟的机械脱骨家禽肉（MDPM）上金黄色葡萄球菌的生长情况

注：(1) 乳酸菌加入的浓度为 10^7 个细胞/g。

(2) C：纯培养，L：与胚芽乳杆菌共同培养，P：与啤酒足球共同培养，M：混合培养。

已有报道介绍了一个将杀细菌素的分成四类的分类系统[65]。Klaenhammer 系统主要是以基因和这些化合物的生物化学为基础来分类。第Ⅰ类包括像乳链球菌肽这样的抗生素；第Ⅱ类是像 LactacinF 这样的热稳定小肽；第Ⅲ类是像 helveticin 这样的易受热的大分子蛋白；第Ⅳ类是与其他因素复合在一起的蛋白质[4,33,65,66,76]。详情见参考资料 4，33，65，66，76。

3.3 内、外在因素的联合作用：跳越概念

在内在因素和外在因素中，单个因素对微生物生长和繁殖的影响已经讨论过了。在

这个“跳越”概念中，多种因素或技术已应用来控制食品微生物。障碍技术、组合保藏以及联合方法都属于这个概念。20 世纪 80 年代的中期，德国人 Leistner 提出了这个“跳越技术”的概念，它应用在某些食品中已经有了一个世纪的历史。举个简单的例子来说明，如在防止蛋白质分解或第一组的肉毒梭状芽孢杆菌芽孢的发芽中，已知能够阻止肉毒梭状芽孢杆菌芽孢的发芽和生长的内在因素和外在因素是：pH＜4.6，A_w＜0.94，10% NaCl，120mg/kg $NaNO_2$，培养温度＜10℃，以及具有大量的好氧微生物群。在配方中运用了“跳越”概念的食品包含了一系列以上提及的食品，这个概念是用多目标途径来阻止这些芽孢的发芽。为了生长，微生物必须“跳越”一系列障碍。许多已知的因素都可以用作食品系统的跳栏，越来越多的品质稳定的未来食品都可能包含这个概念。

参 考 文 献

[1] Ahmad, H. A., and J. A. Marchello. 1989. Effect of gas atmosphere packaging on psychrotrophic growth and succession on steak surfaces. *J. Food Sci.* 54: 274～276, 310.

[2] Anderson, C. B., and L. D. Witter. 1982. Glutamine and proline accumulation by *Staphylococcus aureus* with reduction in water activity. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1501～1503.

[3] Bala, K., W. C. Stringer, and H. D. Naumann. 1977. Effect of spray sanitation treatment and gaseous atmospheres on the stability of prepackaged fresh beef. *J. Food Sci.* 42: 713～746.

[4] Barefoot, S. F., and D. A. Grinstead. 1993. Bacteriocins from dairy propionibacteria and inducible bacteriocins of lactic acid bacteria. In *Bacteriocins of Lactic Acid Bacteria*, ed. D. G. Hoover and L. R. Steenson, 219～231. New York: Academic Press.

[5] Barnes, E. M., and M. Ingram. 1955. Changes in the oxidation-reduction potential of the sterno-cephalicus muscle of the horse after death in relation to the development of bacteria. *J. Sci. Food Agr.* 6: 448～455.

[6] Barnes, E. M., and M. Ingram. 1956. The effect of redox potential on the growth of *Clostridium welchii* strains isolated from horse muscle. *J. Appl. Bacteriol.* 19: 117～128.

[7] Bate-Smith, E. C. 1948. The physiology and chemistry of rigor mortis, with special reference to the aging of beef. *Adv. Food Res.* 1: 1～38.

[8] Beumer, R. R., M. C. Te Giffel, L. J. Knox, F. M. Rombouts, and T. Abee. 1994. Effect of exogenous proline, betaine, and carnitine of growth of *Listeria monocytogenes* in a minimal medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1359～1363.

[9] Biorck, L. 1978. Antibacterial effect of the lactoperoxidase system on psychrotrophic bacteria in milk. *J. Dairy Res.* 45: 109～118.

[10] Bjorck, L., and C.-G. Rosen. 1976. An immobilized two-enzyme system for the activation of the lactoperoxidase antibacterial system in milk. *Biotechnol. Bioengin.* 18: 1463～1472.

[11] Blickstad, E., S.-O. Enfors and G. Molin. 1981. Effect of hyperbaric carbon dioxide pressure on the microbial flora of pork stored at 4 or 14℃. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 493～504.

[12] Blickstad, E., and G. Molin. 1983. The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4℃. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 45～56.

[13] Briskey, E. J. 1964. Etiological status and associated studies of pale, soft, exudative porcine muscu-

lature. *Adv. Food Res.* 13: 89～178.

[14] Brown, A. D. 1964. Aspects of bacterial response to the ionic environment. *Bacteriol. Rev.* 28: 296～329.

[15] Brown, A. D. 1974. Microbial water relations: Features of the intracellular composition of sugar tolerant yeasts. *J. Bacteriol.* 118: 769～777.

[16] Brown, A. D. 1976. Microbial water stress. *Bacteriol. Rev.* 40: 803～846.

[17] Brown, M. H., and O. Emberger. 1980. Oxidation-reduction potential. In *Microbial Ecology of Foods*, 112～115. New York: Academic Press.

[18] Brown, W. D., M. Albright, D. A. Watts, B. Heyer, B. Spruce, and R. J. Price. 1980. Modified atmosphere storage of rockfish (*Sebastes miniatus*) and silver salmon (*Oncorhynchus kisutch*). *J. Food Sci.* 45: 93～96.

[19] Burleson, G. R., T. M. Murray, and M. Pollard. 1975. Inactivation of viruses and bacteria by ozone, with and without sonication. *Appl. Microbiol.* 29: 340～344.

[20] Callow, E. H. 1949. Science in the imported meat industry. *J. Roy. Sanitary Inst.* 69: 35～39.

[21] Charlang, G., and N. H. Horowitz. 1974. Membrane permeability and the loss of germination factor from *Neurospora crassa* at low water activities. *J. Bacteriol.* 117: 261～264.

[22] Christian, J. H. B. 1955. The water relations of growth and respiration of *Salmonella oranienburg* at 30 C. *Aust. J. Biol. Sci.* 8: 490～497.

[23] Christian, J. H. B. 1963. Water activity and the growth of microorganisms. In *Recent Advances in Food Science*, ed. J. M. Leitch and D. N. Rhodes, vol. 3., 248～255. London: Butterworths.

[24] Christian, J. H. B. 1980. Reduced water activity. In *Microbial Ecology of Foods*, 70～91. New York: Academic Press.

[25] Christian, J. H. B., and J. A. Waltho. 1966. Water relations of *Salmonella oranienburg*; stimulation of respiration by amino acids. *J. Gen. Microbiol.* 43: 345～355.

[26] Chung, K. C., and J. M. Goepfert. 1970. Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci.* 35: 326～328.

[27] Clark, D. S., and C. P. Lentz. 1973. Use of mixtures of carbon dioxide and oxygen for extending shelf-life of prepackaged fresh beef. *Can Inst. Food Sci. Technol. J.* 6: 194～196.

[28] Conway, E. J., and M. Downey. 1950. pH values of the yeast cell. *Biochem. J.* 47: 355～360.

[29] Corlett, D. A., Jr., and M. H. Brown. 1980. pH and acidity. In *Microbial Ecology of Foods*, 92～111. New York: Academic Press.

[30] Csonka, L. N. 1989. Physiological and genetic responses of bacteria to osmotic stress. *Microbiol. Rev.* 51: 121～147.

[31] Csonka, L. N., and A. D. Hanson. 1991. Prokaryotic osmoregulation: Genetics and physiology. *Ann. Rev. Microbiol.* 45: 569～606.

[32] Dack, G. M., and G. Lippitz. 1962. Fate of staphylococci and enteric microorganisms introduced into slurry of frozen pot pies. *Appl. Microbiol.* 10: 472～479.

[33] Daeschel, M. A. 1989. Antimicrobial substances from lactic acid bacteria for use as food preservatives. *Food Technol.* 43 (1): 164～167.

[34] Daniels, J. A., R. Krishnamurthi, and S. S. H. Rizvi. 1985. A review of effects of carbon

dioxide on microbial growth and food quality. *J. Food Protect.* 48: 532～537.

[35] Daud, H. B., T. A. McMeekin, and J. Olley. 1978. Temperature function integration and the development and metabolism of poultry spoilage bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 650～654.

[36] Dixon, N. M., and D. B. Kell. 1989. The inhibition by CO_2 of the growth and metabolism of micro-organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 109～136.

[37] Edgley, M., and A. D. Brown. 1978. Response of xerotolerant and nontolerant yeasts to water stress. *J. Gen. Micribiol.* 104: 343～345.

[38] Enfors, S. -O., and G. Molin. 1978. The influence of high concentrations of carbon dioxide on the germination of bacterial spores. *J. Appl. Bacteriol.* 45: 279～285.

[39] Enfors, S. -O., and G. Molin. 1980. Effect of high concentrations of carbon dioxide on growth rate of *Pseudomonas fragi*, *Bacillus cereus* and *Streptococcus cremoris*. *J. Appl. Bacteriol.* 48: 409～416.

[40] Enfors, S. -O., and G. Molin. 1981. The influence of temperature on the growth inhibitory effect of carbon dioxide on *Pseudomonas fragi* and *Bacillus cereus*. *Can. J. Microbiol.* 27: 15～19.

[41] Erichsen, L., and G. Molin. 1981. Microbial Hora of normal and high pH beef stored at 4℃ in different gas environments. *J. Food Protect.* 44: 866～869.

[42] Evans, J. B., and C. F. Niven, Jr. 1960. Microbiology of meat: Bacteriology. In *The Science of Meat and Meat Products*. San Francisco: Freeman.

[43] Florey, H. W. 1946. The use of micro-organisms for therapeutic purposes. *Yale J. Biol. Med.* 19: 101～118.

[44] Foegeding, P. M., and F. F. Busta. 1983. Effect of carbon dioxide, nitrogen and hydrogen gases on germination of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Protect.* 46: 987～989.

[45] Geis, A., J. Singh, and M. Teuber. 1983. Potential of lactic streptococci to produce bacteriocin. *Appl. Environ, Microbiol.* 45: 205～211.

[46] Genigeorgis, C. A. 1985. Microbial and safety implications of the use of modified atmospheres to extend the storage life of fresh meat and fish. *Int. J. Food Microbiol.* 1: 237～251.

[47] Gill, C. O., and K. N. Tan. 1980. Effect of carbon dioxide on growth of meat spoilage bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 317～319.

[48] Goepfert, J. M., and H. U. Kim. 1975. Behavior of selected foodborne pathogens in raw ground beef. *J. Milk Food Technol.* 38: 449～452.

[49] Grothe, S., R. L. Krogsrud. D. J. McClellan, J. L. Milner, and J. M. Wood. 1986. Proline transport and osmotic stress response in *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* 166: 253～259.

[50] Hanks, H., R. Nickelson Ⅱ, and G. Finne, 1980. Shelf-life studies on carbon dioxide packaged finfish from the Gulf of Mexico. *J. Food Sci.* 45: 157～162.

[51] Hewitt, L. F. 1950. *Oxidation-Reduction Potentials in Bacteriology and Biochemistry*, 6th ed. Edinburgh: Livingston.

[52] Hintlian, C. B., and J. H. Hotchkiss. 1987. Comparative growth of spoilage and pathogenic organisms on modified atmosphere-packaged cooked beef. *J. Food Protect.* 50: 218～223.

[53] Hobbs, B. C. 1968. *Food Poisoning and Food Hygiene*, 2d ed. London: Edward Arnold.

[54] Holzapfel, W. H., R. Geisen, and U. Schillinger. 1995. Biological preservation of foods with reference to protective cultures, bacteriocins and food-grade enzymes. *Int. J. Food Microbiol.* 24:

343～362.

[55] Horner, K. J., and G. D. Anagnostopoulos. 1973. Combined effects of water activity, pH and temperature on the growth and spoilage potential of fungi. *J. Appl. Bacteriol.* 36: 427～436.

[56] Hotchkiss, J. H., R. C. Baker, and R. A. Qureshi. 1985. Elevated carbon dioxide atmospheres for packaging poultry. Ⅱ. Effects of chicken quarters and bulk packages. *Poultry Sci.* 64: 333～340.

[57] Huffman, D. L. 1974. Effect of gas atmospheres on microbial quality of pork. *J. Food Sci.* 39: 723～725.

[58] Jakobsen, M., and W. G. Murrell. 1977. The effect of water activity and the a_w-controlling solute on germination of bacterial spores. *Spore Res.* 2: 819～834.

[59] Jakobsen, M., and W. G. Murrell. 1977. The effect of water activity and a_w-controlling solute on sporulation of *Bacillus cereus* T. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 239～245.

[60] Jay, J. M. 1995. Foods with low numbers of microorganisms may not be the safest foods. *Dairy Food Environ. Sanit.* 15: 674～677.

[61] Juven, B. J. 1976. Bacterial spoilage of citrus products at pH lower than 3.5. *J. Milk Food Technol.* 39: 819～822.

[62] Kamau, D. N., S. Doores, and K. M. Pruitt. 1990. Enhanced thermal destruction of *Listeria monocytogenes* and *Staphylococcus aureus* by the lactoperoxidase system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2711～2716.

[63] Kang, C. K., M. Woodburn, A. Pagenkopf, and R. Cheney. 1969. Growth, sporulation, and germination of *Clostridium perfringens* in media of controlled water activity. *Appl. Microbiol.* 18: 798～805.

[64] King, A. D., Jr., and C. W. Nagel. 1975. Influence of carbon dioxide upon the metabolism of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Food Sci.* 40: 362～366.

[65] Klaenhammer, T. R. 1993. Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *FEMS Microbiol. Rev.* 12: 39～86.

[66] Klaenhammer, T. R. 1988. Bacteriocins of lactic acid bacteria. *Biochimie* 70: 337～349.

[67] Ko, R., L. T. Smith, and G. M. Smith. 1994. Glycine betaine confers enhanced osmotolerance and cryotolerance on *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 176: 426～431.

[68] Lambert, A. D., J. P. Smith, and K. L. Dodds. 1991. Effect of headspace CO_2 concentration on toxin production by *Clostridium botulinum* in MAP, irradiated fresh pork. *J. Food Protect.* 54: 588～592.

[69] Law, B. A., and I. A. Mabbitt. 1983. New methods for controlling the spoilage of milk and milk products. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*, ed. T. A. Roberts and F. A. Skinner, 131～150. New York: Academic Press.

[70] Leistner, L., and W. Rodel. 1976. Inhibition of microorganisms in food by water activity. In *Inhibition and Inactivation of Vegetative Microorganisms*, ed. F. A. Skinner and W. B. Hugo, 219～227. London: Academic Press.

[71] Marshall, B. J., F. Ohye, and J. H. B. Christian. 1971. Tolerance of bacteria to high concentrations of NaCl and glycerol in the growth medium. *Appl. Microbiol.* 21: 363～364.

[72] Matches, J. R., and M. E. Lavrisse. 1985. Controlled atmosphere storage of spotted shrimp. (*Pandalus platyceros*). *J. Food Protect.* 48: 709～711.

[73] Morris, E. O. 1962. Effect of environment on micro-organisms. In *Recent Advances in Food Science*, ed. J. Hawthorn and J. M. Leitch, vol. 1, 24～36. London: Butterworths.

[74] McMullen, L., and M. E. Stiles. 1989. Storage life of selected meat sandwiches at 4 C in modified gas atmospheres. *J. Food Protect.* 52: 792～798.

[75] Mossel, D. A. A., and M. Ingram. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.* 18: 232～268.

[76] Nettles, C. G., and S. F. Barefoot. 1993. Biochemical and genetic characteristics of bacteriocins of food-associated lactic acid bacteria. *J. Food Protect.* 56: 338～356.

[77] Newton, K. G., J. C. L. Harrison, and K. M. Smith. 1977. The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at −1℃. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 53～59.

[78] Olley, J., and D. A. Ratkowsky. 1973. The role of temperature function integration in monitoring fish spoilage. *Food Technol. New Zealand* 8: 13～17.

[79] Parekh, K. G., and M. Solberg. 1970. Comparative growth of *Clostridium perfringens* in carbon dioxide and nitrogen atmospheres. *J. Food Sci.* 35: 156～159.

[80] Park, S., L. F. Smith, and G. M. Smith. 1995. Role of glycine betaine and related osmolytes in osmotic stress adaptation in *Yersinia enterocolitica* ATCC 9610. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4378～4381.

[81] Parkin, K. L., M. J. Wells, and W. D. Brown. 1981. Modified atmosphere storage of rockfish fillets. *J. Food Sci.* 47: 181～184.

[82] Patchett, R. A., A. F. Kelly, and R. G. Kroll. 1992. Effect of sodium chloride on the intracellular solute pools of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 3959～3963.

[83] Pena, A., G. Cinco. A. Gómez-Puyou, and M. Tuena. 1972. Effect of pH of the incubation medium on glycolysis and respiration in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch. Biochem. Biophys.* 153: 113～425.

[84] Peterson, A. C., J. J. Black, and M. F. Gunderson. 1962. Staphylococci in competition. I. Growth of naturally occurring mixed populations in precooked frozen foods during defrost. *Appl. Microbiol.* 10: 16～22.

[85] Pitt, J. I. 1975. Xerophilic fungi and the spoilage of foods of plant origin. In *Water Relations of Foods*, ed. R. B. Duckworth, 273～307. London: Academic Press.

[86] Prior, B. A. 1978. The effect of water activity on the growth and respiration of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Appl. Bacteriol.* 44: 97～106.

[87] Raccach, M., and R. C. Baker. 1978. Lactic acid bacteria as an antispoilage and safety factor in cooked, mechanically deboned poultry meat. *J. Food Protect.* 41: 703～705.

[88] Ratkowsky, D. A., J. Olley, T. A. McMeekin, and A. Ball. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *J. Bacteriol.* 149: 1～5.

[89] Rattray, J. B. M., A. Schibeci, and D. K. Kidby 1975. Lipids of yeasts. *Bacteriol. Rev.* 39: 197～231.

[90] Reay, G. A., and J. M. Schewan. 1949. The spoilage of fish and its preservation by chilling. *Adv. Food Res.* 2: 343～398.

[91] Reed, R. K., J. A. Chudek, R. Foster, and G. M. Gadd. 1987. Osmotic significance of glycerol accumulation in exponentially growing yeasts. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2119～2123.

[92] Reiter, B., and G. Harnulv. 1984. Lactoperoxidase antibacterial system: Natural occurrence, biological functions and practical applications. *J. Food Protect.* 47: 724～732.

[93] Roberts, R. F., and G. S. Torrey. 1988. Inhibition of psychrotrophic bacterial growth in refrigerated milk by addition of carbon dioxide. *J. Dairy Sci.* 71: 52～60.

[94] Rose, A. H. 1965. *Chemical Microbiology*, ch. 3. London: Butterworths.

[95] Rothstein, A., and G. Demis. 1953. The relationship of the cell surface to metabolism. The stimulation of fermentation by extracellular potassium. *Arch. Biochem. Biophys.* 44: 18～29.

[96] Salisbury, F. B., and C. Ross. 1969. *Plant Physiology*. 467. Belmont, CA: Wadsworth.

[97] Sears, D. F., and R. M. Eisenberg. 1961. A model representing a physiological role of CO_2 at the cell membrane. *J. Gen. Physiol.* 44: 869～887.

98] Seideman, S. C., and P. R. Durland. 1984. The utilization of modified gas atmosphere packaging for fresh meat. A review. *J. Food Qual.* 6: 239～252.

[99] Seideman, S. C., Z. L. Carpenter, G. C. Smith, C. W. Dill, and C. Vanderzant. 1979. Physical and sensory characteristics of beef packaged in modified gas atmospheres. *J. Food Protect.* 42: 233～239.

[100] Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety* 6: 29～44.

[101] Sherman, J. M. and G. E. Holm. 1922. Salt effects in bacterial growth. Ⅱ. The growth of *Bacterium coli* in relation to H ion concentration. *J. Bacteriol.* 7: 465～470.

[102] Shinefield, H. R., J. C. Ribble, and M. Boris. 1971. Bacterial interference between strains of *Staphylococcus aureus*, 1960 to 1970. In *The Staphylococci*, ed. J. O. Cohen, 503～515. Wiley-Interscience: New York.

[103] Silliker, J. H., and S. K. Wolfe. 1980. Microbiological safety considerations in controlledatmosphere storage of meats. *Food Technol.* 34 (3): 59～63.

[104] Sperber, W. H. 1983. Influence of water activity on foodborne bacteria—A review. *J. Food Protect.* 46: 142～150.

[105] Stenstrom, I. -M. 1985. Microbial flora of cod fillets (*Gadus morhua*) stored at 2 C in different mixtures of carbon dioxide and nitrogen/oxygen. *J. Food Protect.* 48: 385～389.

[106] Stier, R. F., L. Bell, K. A. Ito, B. D. Shafer, L. A. Brown, M. L. Seeger, B. H. Allen, M. N. Porcuna, and P. A. Lerke, 1981. Effect of modified atmosphere storage on *C. botulinum* toxigenesis and the spoilage microflora of salmon fillets. *J. Food Sci.* 46: 1639～1642.

[107] Townsend, D. E., and B. J. Wilkinson. 1992. Proline transport in *Staphylococcus aureus*: A high-affinity system and a low-affinity system involved in osmoregulation. *J. Bacteriol.* 174: 2702～2710.

[108] Troller, J. A. 1986. Water relations of foodborne bacterial pathogens An updated review. *J. Food Protect.* 49: 656～670.

[109] Troller, J. A. 1984. Effect of low moisture environments on the microbial stability of foods. In *Food Microbiology*, ed. A. H. Rose, 173～198. New York: Academic Press.

[110] Wabeck, C. J., C. E. Parmalee, and W. J. Stadelman. 1968. Carbon dioxide preservation of fresh poultry. *Poultry Sci.* 47: 468～474.

[111] Walden, W. C., and D. J. Hentges. 1975. Differential effects of oxygen and oxidationreduction potential on the multiplication of three species of anaerobic intestinal bacteria. *Appl. Microbiol.* 30: 781～785.

[112] Wei, C. I., M. O. Balaban, S. Y. Fernando, and A. J. Peplow. 1991. Bacterial effect of high pressure CO_2 treatment on foods spiked with *Listeria* or *Salmonella*. *J. Food Protect.* 54: 189~193.

[113] Wodzinski, R. J., and W. C. Frazier. 1961. Moisture requirements of bacteria. Ⅱ. Influence of temperature, pH, and maleate concentration on requirements of *Aerobacter aerogenes*. *J. Bacteriol.* 81: 353~358.

[114] Zapico, P., P. Gaya, M. Nuñez, and M. Medina. 1994. Activity of goats'milk lactoperoxidase system on *Pseudomonas fluorescens* and *Escherichia coli* at refrigeration temperatures. *J. Food Protect.* 58: 1136~1138.

第三部分　食品中的微生物

4. 鲜肉和家禽

人们普遍认为在动物肉体没有完全耗尽的情况下，刚屠宰的健康动物的内部组织没有细菌。但是当检测零售的鲜肉和家禽的时候，人们会发现存在不同数量和种类的微生物。以下就是微生物进入鲜肉特别是牛、羊肉的途径：

屠宰刀：将如小公牛的动物击晕，然后绑住其后腿并吊起来，用被称为“屠宰刀”的工具切开颈部的血管将其放血。如果刀没有经过消毒，微生物就会进入血管而在动物体内沉积下来。

动物毛皮：毛皮中的微生物可通过屠宰刀进入动物体。毛皮中的微生物也可沉积在毛下的胴体或切下的鲜肉的表面。毛皮中的一些微生物会污染空气及已除去皮毛的胴体，如下述。详见有关胴体消毒和清洗的内容。

胃肠道：肠道内通常含有大量的微生物，这些微生物会通过刺穿的肠道而沉积在刚刚除去皮毛的胴体表面。这里要特别强调的是在胃中或反刍动物的瘤胃中含有约 10^{10}g/细菌。

屠夫的手：正如第二部分 2 中所描述的，这是一个人类的病原菌进入刚屠宰的鲜肉的途径。即使戴上手套，微生物也能够从一个胴体转移到另一个胴体上。

器皿：未消毒的器皿中的微生物会污染放在器皿中的肉块。这可能是肉渣和碎肉中微生物的主要来源。

屠宰和保藏的环境：流通的空气也是所有屠宰的动物的表面微生物的一个重要的来源。这在第二部分中有所描述。

淋巴结：在鲜肉中，包埋在脂肪中的淋巴结一般含有大量的微生物，特别是细菌。如果把它们切碎或加到肉渣中，可以预料这些肉中将含有大量的微生物。

4.1　僵直的生化反应

通常大多数动物在屠宰时都是用未消毒的容器。当在同一个屠宰场并在同一天屠宰和处理几千只动物时，胴体外部的微生物会在动物胴体中形成一定的数量，尽管这需要几天的时间。可以料想这些零售产品中的微生物带来的实际影响。

牛在屠宰以后胴体内发生一系列反应才形成最终的肉产品。Lawrie[63]曾详细讨论过这些反应，这里仅以提纲的形式列出这些内容。以下为屠宰的动物体内发生的不同阶段

的反应：

①循环停止：失去重新合成 ATP（三磷酸腺苷）的能力。ATP 的缺少引起肌动蛋白和肌球蛋白合成导致肌肉变硬的肌动球蛋白；

②供氧下降：结果是氧化还原电势的降低；

③维生素和抗氧化剂的供应停止：结果造成肉缓慢酸败；

④神经和激素的调节停止：动物体温下降和脂肪固化；

⑤呼吸停止：停止合成 ATP；

⑥糖酵解开始：使大多数糖原转化成乳酸，将 pH 由 7.4 下降到最终的 5.6、pH 的下降也引起蛋白质变性，释放和活化组织蛋白酶，造成尸体僵硬。在蛋白质变性作用中，肌肉蛋白中二价阳离子和单价阳离子发生交换；

⑦网状内皮系统杂质的排除停止：使微生物可以不受抑制地生长；

⑧各种代谢物积累：促使蛋白质积累。

常温下刚屠宰的新鲜的牛胴体内（2～5℃）这些作用需要进行 24～36h。其间，肉中部分微生物菌群来自于动物自身淋巴结[56]、放血用的尖刀、动物皮毛、胃肠道、灰尘、屠夫的手、切肉刀和储藏罐等。在冷藏温度下，贮藏过程中微生物腐败就开始了。实际上此时肉内部的温度还未降到冷藏的温度范围，很有可能是内部的细菌引起这种腐败作用。这些微生物主要是产气荚膜杆菌，属于肠细菌科。另外，总体来说冰箱保藏的肉中的细菌腐败作用就反映了外部腐败微生物菌群的作用结果。

4.2　肉和禽中的微生物

在未腐败的肉产品中发现的主要细菌、酵母菌和霉菌列在表 4.1 和表 4.2。通常这些微生物反映出屠宰和加工环境的情况，其中革兰式阴性菌数量较多。在革兰氏阳性菌中，肠球菌为主要细菌，并常伴有乳杆菌出现。由于霉菌在肉加工环境中分布广泛，可以预料肉中有大量霉菌产生，包括青霉、毛霉和芽枝霉。在肉、禽中可发现大多数普遍存在的酵母为假丝酵母和胶红酵母（表 4.2）。

表 4.1　　**肉、禽中的主要细菌**

微生物的属	革兰氏染色反应	鲜　肉	鲜　肝	家　禽
不动杆菌	−	××	×	××
产气单孢菌	−	××		×
产碱杆菌	−	×	×	·
芽孢杆菌	+	×		×
索丝菌	−	×	×	×
弯曲杆菌	−			××
肉杆菌	−	×		
柠檬杆菌		×		×

续表

微生物的属	革兰氏染色反应	鲜　肉	鲜　肝	家　禽
梭状芽孢杆菌	−	×̸		×
棒状杆菌	+	×̸	×	××̸
肠杆菌	−	×̸		×̸
肠球菌	+	××̸	×	×
埃希氏菌	−	×		×
黄杆菌	−	×̸	×	×̸
哈夫尼菌	−	×		
考克氏菌	−	×̸	×	×̸
库特氏菌	−	×		
乳球菌	−	×̸		
乳杆菌	+	×		
明串珠菌	+	×̸	×	
李斯特氏菌	+	×		××̸
微杆菌	+	×		×̸
微球菌	+	×̸	××	×
莫拉氏菌	−	××̸	×̸	×
类芽孢杆菌	+	×̸		×̸
泛菌	−	×		×̸
片球菌	−	×		
变形菌		×̸		×
假单孢菌	−	××̸		××̸
嗜冷杆菌	−	××		×
沙门氏菌		×		×
沙雷氏菌		×		×̸
希瓦氏菌	+	×		
葡萄球菌	+	×	×	×
漫游球菌	+			××̸
魏斯氏菌	+	×	×	
耶尔森氏菌		×		

注：×̸＝已经存在于肉中的菌株；××＝经常报道的菌株。

表 4.2　肉、禽中的主要真菌

微生物的属	新鲜和冷藏的肉	家　禽
霉菌		
格链孢霉	×	×
曲霉	×	×
枝孢霉	××	×

续表

微生物的属	新鲜和冷藏的肉	家　禽
镰刀霉菌	×	
白地霉	××	×
红曲霉	×	
丛梗孢	×	
毛霉	××	×
链孢霉	×	
青霉	×	×
根霉	××	×
孢子菌丝	××	
枝霉	××	
酵母		
假丝酵母	××	××
隐球酵母	×	×
德巴利氏酵母	×	
汉逊氏酵母	×	
毕赤氏酵母	×	×
红酵母	×	××
酵母		×
球拟酵母	××	×
丝孢酵母	×	×

注：(1) ×＝已知存在于肉中的菌株；××＝经常报道的菌株。

(2) 资料来源：摘自文章和参考文献 21 和 55。

4.3　鲜肉中微生物存在的偶然性和普遍性

已报道的微生物在鲜肉中的存在情况见表 4.3。同整肉如肉排相比，如牛肉渣的碎肉中含有更多的微生物。这在八十多年中已形成了共识，并且有一些原因可以说明碎肉比整肉含有更多的微生物：

①商品肉馅由各种肉块的修整下脚料组成，在处理过程中这些肉块通常被大量的微生物污染。而直接由大块肉加工成的肉馅通常含有较少的微生物；

②碎肉具有更大的表面积，这一点就可以在某种程度上说明微生物菌落增加。可以料想随着碎肉颗粒的减少，其表面积增大，最终造成其表面的微生物增多；

③碎肉表面积的增大有利于好氧细菌生长，它们通常是低温腐败菌；

④在一些商业机构中，碎肉机、切肉刀和盛肉的器皿都很少进行防止微生物污染所必需的经常和全面的清洗。在一家大的杂货店的肉食部的不同地方采样并进行细菌学研究所获得的数据就可以说明这一点。在三个不同地方清洗肉锯的刮刀和切肉的砧板后立即进行棉试，得到以下结果：刮刀总体上 lg0.82/cm^2，大肠杆菌 2.3，肠球菌 3.64，葡萄球菌 1.60，小球菌 3.69；砧板平均 lg0.88/cm^2，大肠杆菌 2.04，肠体菌 3.77，葡萄

球菌<1.00，小球菌 3.79。这些来源导致碎肉中细菌总数较高；

⑤由于加工肉都经过碎肉机，所以一块严重染菌的肉足以污染其他的肉以及全部肉。这些染菌较重的部分通常为淋巴结，而这些淋巴结通常包埋在肥肉中。这些组织含有大量的微生物，这在一定程度上可以说明绞碎的纯精牛肉比碎牛肉含有更多的微生物。在一些描述中，前者可能含有高达牛脂肪中菌体总量 30%的菌体量，而后者所含菌体量不会高于脂肪中菌体量的 20%。

表 4.3　　在满足特定菌数指标的红肉中微生物的相对含量

产　品	样品数	微生物组/指标	满足指标样品率/%	参考文献
生牛肉馅饼	735	APC：lg6.00（或更低）/g	76	107
	735	大肠菌群：lg2.00（或更低）/g	84	107
	735	大肠杆菌：lg2.00（或更低）/g	92	107
	735	金黄色葡萄球菌：2.00（或更低）/g	85	107
		沙门氏菌存在		
	735	APC：6.70（或更低）/g	0.4	107
新鲜碎牛肉[a]	1830	金黄色葡萄球菌：3.00（或更低）/g	89	13
	1830		92	13
	1830	大肠杆菌：1.70（或更低）/g	84	13
	1830	沙门氏菌存在	2	13
	1830	产气荚膜杆菌存在	20	13
新鲜碎牛肉	1090	APC≥7.00（或更低）/g，35℃	88	86
	1090	粪便大肠菌群≤2.00g	76	86
	1090	金黄色葡萄球菌<2.00/g	91	86
冷冻碎牛肉馅饼	604	APC：6.00（或更低）/g	67	39
	604	大肠杆菌<2.70g	85	39
	604	大肠杆菌>3.00g，MPN	9	39
煎牛排	107	APC 21℃，72h，<3.00/g	76	23
	107	肠球菌，大肠菌群，金黄色葡萄球菌不存在沙门氏菌	100	23
粉碎的野兽肉	113	大肠菌群：2.00（或更低）/g	12	103
	113	大肠杆菌：2.00（或更低）/g	75	103
	113	金黄色葡萄球菌：2.00（或更低）/g	96	103

注：APC＝好氧平板菌数；MPN＝最大可能数量。

[a] 在当时有效的俄勒冈法规下。

在各种形式的肉中可以同时发现芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌。Steinkrous 和 Ayres[104] 通过对新鲜的和经腌制的猪修整下脚料肉和罐装牛餐肉中易造成腐败的厌氧菌芽孢的存在情况进行研究后发现：这些微生物的浓度水平很低，通常小于 1 个/g。通过研究肉中梭状芽孢杆菌的芽孢的存在情况，Greenberg 等人[40]发现在 2358 个肉样品中易造成腐败的厌氧菌芽孢数平均为 2.8 个/g。通过分离 19727 个易腐败厌氧菌芽孢，只有一个是肉毒杆菌芽孢，它是从鸡肉中发现的。这些研究者所研究的大量的肉样包括美国和加拿大各地的牛肉、猪肉和鸡肉。在罐头加工中对这些微生物进行热灭菌时会遇到一些由肉中的易腐败好氧菌芽孢引发的问题（见第五部分 16）。

从日本的34%的零售猪肉样品和瑞典的4%～54%的猪里脊肉中可分离出猪红斑丹毒丝菌。另外猪肉中可以发现各种变型血清，并且一些分离体具有老鼠所带病菌的毒性（见第四部分12，猪红斑丹毒丝菌和单核细胞增生李斯特氏菌的分类学关系）。

Strong 等人[106]已研究了在各种美国食品中产气荚膜杆菌的存在情况。他们从16.4%的生肉、家禽和试验鱼，5%的调味料，3.8%的水果和蔬菜，2.7%商品冷冻食品，1.8%的家庭自备食品中恢复这种微生物。其他人发现在新鲜的和处理过的肉中这种微生物数量较少。在95个碎牛肉样品中，有87%的样品含有浓度为100/g或稍低一些的产气荚膜杆菌，而95个样品中有45个样品[47]含有浓度小于1000/g的产气荚膜杆菌[62]。在猪胴体，心脏和脾脏中不能恢复产气荚膜杆菌，但在21.4%的肝脏中能恢复此微生物[7]。在38.9%的商品猪肉肠中普遍存在这种微生物。第七部分21中主要讨论了产气荚膜杆菌在食品中的作用。

新鲜和冷冻的牛肉、猪肉以及相关的肉制品中，普遍存在肠细菌科的微生物。通过Stiles和Ng[105]对442个肉样进行检测发现其中86%产生肠道细菌，而127个碎牛肉样品都产生肠道细菌。最常见的是生物型1大肠埃希氏杆菌（29%）、液化沙雷氏菌（17%）、成团泛菌（12%）。721个单离体（32%）总体上以弗氏柠檬酸杆菌、肺炎克雷伯氏菌、阴沟肠细菌和哈夫尼埃希氏杆菌为代表。用最大可能数量方法检测10类食品，702个样品的大肠菌群，在119个碎牛肉样品中可发现最大数量，用分析化学家协会方法可得几何平均数为59/g，94个猪肉肠样品中菌数平均为7.9/g。在32个碎羊肉样品中大肠杆菌平均为lg2.88、肠细菌平均为3.07，lgAPC平均为6.57[80]。关于大肠菌群、肠球菌和其它作为指标的微生物的存在情况的内容详见第六部分18。

4.3.1　加大豆的肉馅

在美国快餐业普遍在肉馅饼中添加10%～30%的大豆蛋白（大豆粉、大豆片、达到一定稠度的大豆蛋白），人们已经研究了这些大豆混合物中的微生物。最初，Craven和Mercuri[15]进行了许多细致的研究，他们发现在碎牛肉或鸡肉中混入10%或30%的大豆并在4℃保存8～10d后，这些制品的APC值增高，并超过了未混合大豆的对照物。而牛肉-大豆混合物中的大肠菌群数量也高于对照物，这与鸡肉-大豆混合物一致。通常，混合30%的大豆比混合10%的大豆有更高的APC值。在一个实验中，在碎牛肉中添加25%的大豆，同未混合大豆的碎牛肉在4℃保存7.5d相比，牛肉-大豆混合物在4℃保存5.3d后腐败。在另一个实验中分别混合10%、20%和30%的大豆，其APC值随时间的延长和混合物中大豆浓度的升高而显著增大[59]。

至于大豆制品中微生物，1226个晒干制品的样品的平均lgAPC为1500个/g，而真菌、大肠菌群、大肠杆菌和金黄色葡萄球菌分别为25、3、3和10个/g[108]。

目前，人们还不清楚细菌在肉-大豆混合物中比在非大豆混合对照物中生长更快的原因。大豆本身并不改变最初的微生物菌落，通常肉-大豆混合物的腐败方式与全肉对照物的腐败方式也不同。一个值得注意的区别是混合大豆制品中pH略高（0.3～0.4单位），而这意味着细菌更快的生长速率。Harrison等人[49]通过用有机酸降低牛肉大豆混合物的pH，而得到了以上的推断。通过在20%的大豆混合物中加入少量的5%的乙酸溶液，同

对照物相比，腐败可延迟两天，但抑制腐败的作用并不仅仅由于 pH 的降低。相对于那些添加大豆的牛肉，在肉馅中加入 25%脂肪，细菌数量没有上升[58]。可能大豆蛋白增加了大豆-肉混合物的表面积，从而在冷藏温度下有利于肉中主要的好氧细菌生长，但这需要有关数据的证明。有关大豆-肉混合物的腐败的内容在后面有所讨论，详见参考文献[22]。

4.3.2 机械去骨的肉、禽和鱼

当动物屠宰后用于消费时，人们用切刀将肉从骨架上分割下来。然而，最有效地剔除骨头上残余的小块瘦肉的方式是用机械方法（机械去骨）。机械去骨肉（MDM）是用机械使肉从骨头上分离下来。在 20 世纪 70 年代人们就开始生产 MDM，而最早使用机械方法是在 20 世纪 50 年代末生产鸡肉和 40 年代末生产鱼肉[29,32]。在去骨过程中，少量的骨粉成为最终产品的一部分，1978 年美国农业部（USDA）规定骨头的数量（主要为钙含量）不能多于 0.75%（肉中钙含量为 0.01%）。MDM 中最少含有 14%蛋白质并且脂肪不高于 30%。在有关微生物生长方面，MDM 和传统方法加工的肉的最显著区别是前者 pH 较高，一般 6.0～7.0[29,30]，pH 升高是由于 MDM 中掺入了骨髓。

对 MDM 中微生物的许多研究表明这些制品同传统方法生产的制品没什么差别，但已发现一些 MDM 含有较高的微生物数量。去骨家禽中的微生物性质同其它未处理家禽制品相比，虽然微生物数量是可比的，但商品 MDM 制品中大肠菌群的最大可能数量范围从（460～>1100）个/g。54 个样品中有 6 个含有沙门氏菌，有 4 个含有产气荚膜杆菌，但没有样品含有金黄色葡萄球菌[84]。手工去骨的羊胸中发现 APC 值为 680000，而机械去骨的羊肉可保存 1 星期，其 APC 值为 650000 个/g[31]。商品机械去骨鱼样品中含有的微生物数量比传统方法加工的鱼高 10 倍，尽管使用的方法不同，但都会在鱼骨架和机械去骨肉（MDF）上形成一定数量的微生物[93]。研究人员没有在样品中发现金黄色葡萄球菌，他们得出结论 MDF 的腐败与传统方法加工的肉制品的腐败有些相似。在以后的研究中，人们发现 MDM 比瘦的碎牛肉更有利于嗜冷细菌的快速生长[92]。

某些研究已表明 MDM 中没有金黄色葡萄球菌，这可能是由于这些制品很少用切刀处理。通常，在样品中嗜温性微生物的数量稍高于嗜冷性微生物，并且很少发现革兰氏阴性菌。Field[29]总结出在正确的手工操作下，MDM 不应出现微生物的问题，Froning[32]也得出有关去骨家禽和鱼的相似的结论。

4.3.3 热剔骨的肉

传统的肉加工过程中（冷剔骨），屠宰后的动物胴体冷冻 24h 并在冷冻状态下进行加工（肉体僵硬）。热剔骨（热处理）通常在屠宰后（肉体僵硬前）1～2h 内在胴体仍处于"热"的状态下进行。

通常热剔骨肉中的微生物与冷剔骨肉中的差不多，但也存在着一些区别。最早对热剔骨火腿进行的研究评价了由热剔骨肉（热处理火腿）制成的风干火腿中的微生物的性质。这些火腿中含有大大高于冷剔骨火腿的 APC（37 C），并且前者中 67%产生葡萄球

菌而后者只有47%[89]。在35℃，热剔骨上等肉中的嗜温微生物数量明显高于相应的冷剔骨肉，二者都是在2℃真空包装保存20d之前和之后进行测定的[60]。热剔骨对于大肠菌群似乎没有影响。另一个早期研究是由Barbe等人[7]进行的，他们检测了19对火腿（热剔骨和冷剔骨），发现前者含有细菌200/g，而后者为220/g。在一个实验中，在宰后16h，16℃热去骨肉和2℃冷去骨牛肉中的嗜温微生物和嗜冷微生物数量没有明显的区别[57]。热去骨和冷去骨牛肉起初都含有较少的微生物，但在保存14d后，热去骨肉比冷去骨肉含有更多的微生物[33]。这些研究表明对于热去骨肉，控制冷却过程的最初几个小时的温度是关键的，在以后的研究中，人们发现在3～9h内由冷却升到21℃会产生较好的结果[34]。

对热去骨猪肉制成的香肠的实验中发现：由热去骨猪肉制成的产品含有的嗜温微生物和解脂微生物的数量明显高于冷去骨肉产品，但对于嗜冷微生物两者没有明显的区别[69]。

McMillin等人观察了延迟冷却对屠宰1h后的热剔骨牛肉上微生物菌群的影响[77]。屠宰后的肉分别冷却1、2、4、8h，随后剁碎，制成馅饼，冷冻并检测。在这些产品和冷剔骨肉产品中，大肠菌群、葡萄球菌、嗜冷细菌和嗜温细菌数量没有明显的区别。同时加工处理热剔骨肉和冷剔骨肉并在2℃真空保存14d后，对其中的微生物菌群进行生物分类学研究，结果揭示在微生物菌群方面二者没有可统计的明显的区别[64]。在保存后两种肉产品中占优势的微生物都为链球菌和乳酸杆菌，而在新鲜的热剔骨肉产品（未保存）中，葡萄球菌和杆菌较多。综上所述，这两种肉产品具有相似性。

对分别由10%和30%MDM与热剔骨肉制成的再制烤羊肉中的微生物进行检测发现：总体上这两种非蒸煮的肉产品的质量都比较好[91]。非蒸煮肉产品中微生物数量$<3.0\times10^4$/g。通常肉产品中MDM越多，微生物数量越高。在含有30%MDM的肉产品中，大肠菌群和粪便大肠菌群的数量明显较高，通常认为这是由在屠宰和开膛过程中小腿和腹部的微生物污染造成的。在未蒸煮肉产品（0.1g）中未发现金黄色葡萄球菌和产气荚膜杆菌；在25g样品中，未发现沙门氏菌，小肠结肠炎耶尔森氏菌或空肠弯曲杆菌。蒸煮可使所有肉产品中的微生物数量减少到<30/g。

Kotula[59]考察了10组样品中热剔骨对肉中微生物的影响，结果显示有6组没有影响，有3组只有有限的影响，只有1组有较高的微生物数量。Kotula得出结论热剔骨对于微生物数量基本上没有影响。热剔骨通常伴随着胴体僵硬前的体内加压，压力约为103.4MPa，并维持2min。这一过程加深肌肉的颜色并使加深的颜色遍布胴体表面，还增强肉体软化作用，但它对微生物菌群没有表现出任何影响。

4.3.3.1 电刺激作用

在热剔骨之前，用电刺激处理动物胴体可加速糖原转化成乳酸。在切未僵硬肉的过程中，动物胴体内pH的快速下降可消除肉体的硬化。在这种方法中，将一支电振器附着在胴体上。在两个电极之间加上400V电压并反复电击0.5～1.0s或更长时间。对10组样品进行研究，考察电刺激对微生物群落的影响，结果发现有6组没影响，2组有微弱的影响，另外2组有一些影响[59]。研究的肉样包括牛肉、羊肉和猪肉。

在研究者中Ockerman和Szczawinski[83]发现通过电刺激会降低APC值，另外他们

发现在电刺激前接种会明显降低牛肉样品的APC，而在电刺激后立即接种样品，APC没有明显降低。后者的结果说明在电刺激过程中溶酶体隔膜破裂，释放出组织蛋白酶[24]，而这对微生物没有影响。人们认为在电刺激过程中的胴体软化作用在一定程度上是溶酶体破坏的结果[24]。在一个研究中，没有发现表面微生物菌落明显减少，而在牛胴骶骨上的肌肉中微生物菌落明显减少[68]。这些研究人员将肉中携带的细菌接入培养基进行电刺激，发现革兰氏阳性菌对电刺激最敏感，其次是革兰氏阴性菌和产孢菌。当在盐溶液或磷酸盐缓冲液中用30V电压处理5min时，大肠杆菌、腐败希瓦氏菌和莓实假单孢菌减少了5个对数周期，而在0.1%蛋白胨或2.5mol/L蔗糖溶液中，基本上没有变化。对于热去骨肉的微生物菌落，电刺激似乎没有明显的效果。

4.3.4 脏器和各种肉制品

这部分主要讨论的是肝脏、肾脏、心脏和牛、猪、绵羊的舌头。它们与这些动物的骨骼肌肉的不同之处在于前者具有较高的pH和糖原水平，特别是肝脏。新鲜牛、猪肝脏的pH范围为6.1～6.5，而肾脏则为6.5～7.0。许多研究者发现在这些制品中微生物数量通常较少，新鲜肝、肾、心和舌头表面微生物的数量范围为lg1.69～lg4.20/cm^2。这些微生物主要包括革兰氏阳性球菌、棒状杆菌、需氧芽孢杆菌、不动莫拉氏杆菌及假单孢菌。据Hanna等人进行的研究[45]，微球菌、链球菌和棒状杆菌是新鲜肝、肾和心脏中三种主要的菌种。在一项研究中，凝结酶阳性的葡萄球菌、大肠菌群和产气荚膜杆菌的数量从lg0.9/cm^2变化到lg1.37/cm^2，但样品中未发现沙门氏菌[93]。

在2℃保存7d和14d或在5℃保存7d后，与暴露保存及PVC膜保存相比，真空包装的牛、猪肝脏和牛肾脏含有更少的微生物[35,45]。与真空包装的非脏器肉一样，在保存28d过程中肝脏的pH降低，而肝和肾中同质和异质发酵乳酸的细菌数量增加。详见本部分中关于肝脏腐败的内容。

4.4 新鲜红肉的微生物腐败

人们已经用牛肉进行了许多处理肉类腐败的研究，这部分内容大部分是以对牛肉的研究为基础的。可以设想猪肉、羊肉、小牛肉和类似的肉都以类似的方式发生腐败。

在所有重要的食物中肉类最易腐败，表4.4可以解释其中的原因，表中列出了一个典型的成年哺乳动物尸体肌肉的化学组成。肉中富含满足细菌、酵母和霉菌生长的所有营养，并且在新鲜肉中微生物可以直接利用这些成分。表4.5中列出了各种肉的共同的化学组成。

表4.1中列出了在新鲜的和腐败的肉禽中常见的细菌。当然，对于某个确定的制品，并非在任何时候都可发现所有的细菌。那些在腐败过程中常见的细菌来自于各种不同的制品。表4.2中列出了从肉和相关制品中分离出的常见的酵母和霉菌。当检测腐败的肉制品时，只能发现大量细菌、霉菌或酵母中的一小部分，几乎在任何情况下，一个或更多微生物的出现标志着给定的肉制品已发生腐败。在非腐败肉中各种微生物菌群的出现

可以作为在加工、处理、包装、保存肉制品的环境中有微生物存在的标志。

表 4.4　已僵直但未发生分解变化的典型成年哺乳动物肌肉的化学组成[63]　单位：%（湿重）

水	75.5
蛋白质	18.0
肌原纤维	
肌球蛋白，原肌球蛋白，X 蛋白质	7.5
肌动蛋白	2.5
肌浆	
肌浆蛋白，球蛋白	5.6
肌红蛋白	0.36
血红蛋白	0.04
线粒体-细胞色素 C	0.002
肌浆网状结构，胶原，弹性蛋白，“网硬蛋白”，固相酶，结缔组织	2.0
脂肪	3.0
可溶非蛋白物质	3.5
含氮物	
肌酸	0.55
肌苷酸	0.30
2-和 3-磷酸吡啶核苷酸	0.07
氨基酸	0.35
肌肽，鹅肌肽	0.30
碳水化合物	
乳酸	0.90
葡萄糖-6-磷酸	0.17
糖原	0.10
葡萄糖	0.01
无机物	
总可溶含磷化合物	0.20
K	0.35
Na	0.05
Mg	0.02
Ca	0.007
Zn	0.005
糖解中间痕量，微量金属，维生素，等	0.10

注：资料来源 R. A. Lawrie（63）肉科学，copyright 1966，Pergamon Press。

表 4.5 肉和肉制品：化学组成的近似百分比[110]

肉和肉制品	水	碳水化合物	蛋白质	脂肪	灰分
牛肉，牛排	55.0	0	16.0	28.0	0.8
牛肉，股肉	69.0	0	19.5	11.0	1.0
大红肠	62.4	3.6	14.8	15.9	3.3
鸡肉（适于烤炙的小鸡）	71.2	0	20.2	7.2	1.1
法兰克福香肠	60.0	2.7	14.2	20.5	2.7
羔羊肉	66.3	0	17.1	14.8	0.9
肝脏（牛）	69.7	6.0	19.7	3.2	1.4
猪肉，介质	42.0	0	11.9	45.0	0.6
火鸡，中间脂肪	58.3	0	20.1	20.2	1.0

注：资料来源 Watt 和 Merrill（110）。

随后就出现了这么一个问题：为什么在腐败的肉中只有一小部分的微生物占优势。对于这个问题可以考察影响腐败微生物生长的内部和外部参数。诸如新鲜牛肉、猪肉、羊肉以及新鲜家禽、水产品和加工肉制品都有具有满足微生物生长的 pH，这些微生物列于表 4.1。对于表中列出的全部微生物，肉制品中有充足的营养和水分来维持其生长。尽管全部肉的氧化还原电位较低，但肉表面的环境可以使氧化还原电位逐渐升高，从而适合绝对好氧和兼性厌氧以及绝对厌氧微生物的生长。无法确定存在问题的肉制品中是否存在抗菌成分。在外部参数中，培养温度对于控制依赖于肉生长的微生物的类型是最重要的，正如这些肉制品通常保存于冷藏温度下。对于肉、禽和水产品腐败的研究已经进行了 40 多年，并已解决了低温保存肉制品的问题。

关于鲜肉特别是牛肉的霉菌腐败，在各种牛肉腐败环境中得到以下霉菌：枝霉、毛霉和根霉，它们在牛肉上形成“胡须”；枝孢霉通常造成“黑斑”；青霉会形成绿色斑片；孢子菌丝和金孢子菌形成“白斑”。若保存温度低于－5℃，霉菌一般不会在肉上生长[70]。从腐败的冷藏牛肉中恢复得到的酵母中总含有假丝酵母和红酵母，在腐败的碎牛肉中解脂假丝酵母和涎沫假丝酵母数量较多[69]。

与新鲜牛胴体腐败不同的是只有细菌造成的牛肉馅或碎牛肉腐败，以下是其中主要的细菌：假单孢菌、产碱杆菌、不动杆菌、莫拉氏菌和产气单孢菌。人们一般认为假单孢菌和莫拉氏不动杆菌是造成腐败的主要因素，而在腐败过程中其他细菌发挥作用较小。两项研究的结果说明，在腐败牛肉中不动杆菌和莫拉氏菌并不像以前所报道的有那么大数量[27,28]。在另一项研究中，新鲜羊胴体上的嗜冷细菌和莫拉氏菌相对较多，而在羊胴体腐败后它们的数量较少[88]。

对从牛肉，羊肉，猪肉和新鲜香肠中得到的好氧革兰氏阴性细菌的研究表明：所有 231 株有极性鞭毛的杆菌是假单孢菌，110 株为非活动性微生物，61 株为莫拉氏菌，49 株为不动杆菌[18]。在低温下引起肉腐败的假单孢菌通常与贝氏手册中命名的菌种不同。

Shaw 和 Latty[95,96]进行了的大量的生物分类学研究，他们根据碳源利用实验将分离

出的大部分微生物分为四组：在肉中分离出 787 株假单孢菌中，89.7%的微生物经过鉴定，其中 49.6%属于第二组，24.9%属于第一组，11.1%属于第三组[96]。第一组和第二组微生物为非荧光性并且卵黄反应为阴性，类似于莓实假单孢菌；第三组微生物有荧光性并且明胶酶阳性。荧光假单孢菌生物型 I 菌株占 3.9%，生物型 II 占 0.9%，恶臭假单孢菌只有一株。在牛肉、猪肉和羊肉以及新鲜和腐败的肉上，这些微生物组的相对存在的情况有些类似[96]。

已知牛大腿肉和四开片肉会发生深层腐败，通常位于骨头特别是骶骨附近。这种腐败类型通常称为“骨头变质”或“酸败”。这种腐败只涉及细菌，其中梭状芽孢杆菌和肠球菌为主要致病菌。腐肉中只存在一小部分细菌的原因主要是培养的温度，而鲜肉的情况与此相反。在一项研究中，肉在冷藏温度下腐败后，只能发现新鲜碎牛肉中的 9 种细菌中的 4 种[54]。Ayres[5]曾经记录：在加工以后 80%以上的新鲜碎牛肉可能含有产色细菌、霉菌、酵母和产孢细菌，但在肉腐败后，只含有非产色细菌、革兰氏阴性短杆菌。尽管在冷藏温度下鲜肉中的一些细菌能够在培养基中生长，但它们缺少同假单孢菌和莫拉氏不动杆菌竞争的能力。

牛肉块表面容易腐败，如牛肉排或烤牛肉。腐败微生物是细菌还是霉菌主要取决于湿度。在冰箱中保存的新鲜肉块在高湿度下更易发生霉菌腐败而不是细菌腐败。这种腐败显著的特点就是表面有黏性，在这些有黏性的地方几乎总能发现致病微生物。较高的 Eh、适当的湿度和低温条件适于假单孢菌生长。在牛肉块表面有时会出现不连续的细菌菌落，特别是污染程度低的时候。表面细菌菌落聚结便形成黏性层，腐败肉的黏性组分主要是由这些黏性层形成的。Ayres[5]证实当表面细菌数量达到 lg7.0～lg7.5/cm² 时便可察觉到一些气味，表面细菌数量达到 lg7.5～lg8.0/cm² 时便会出现黏性物质（图 4.1）。这在图 4.2 中有更深入的描述，与之相关的细菌数量不仅同新鲜家禽的表面腐败有关，而且还与红肉和水产品的腐败有关。

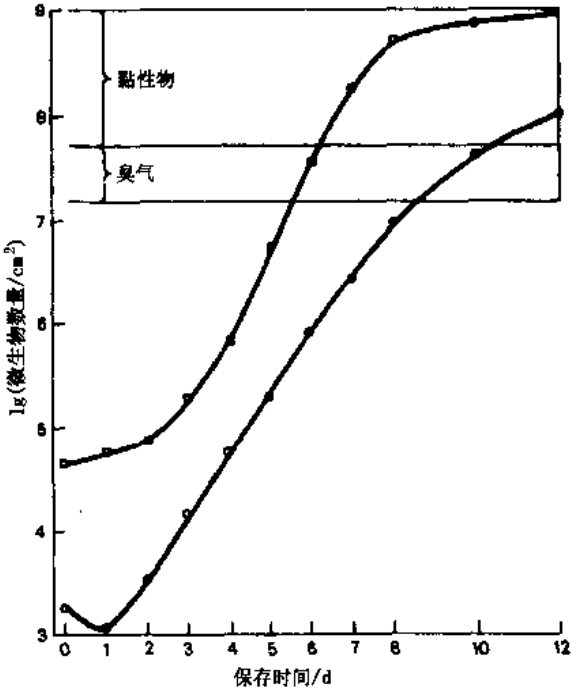


图 4.1　在 5℃保存过程中去毛鸡肉（□）和包装牛肉（○）上臭气和黏性物的发展[5]

当肉表面太干不适于细菌生长或牛肉已用如四环素的抗菌素处理以后，腐败牛肉中霉菌将占优势。实际上当细菌可以在肉上自由生长时，霉菌无法在肉上生长，其原因可能是细菌比霉菌长得快，细菌消耗了霉菌生长同样需要的、可利用的、表面的氧气。

与牛肉块或牛四开片肉的情况不同，在碎牛肉上霉菌生长的很少，除非

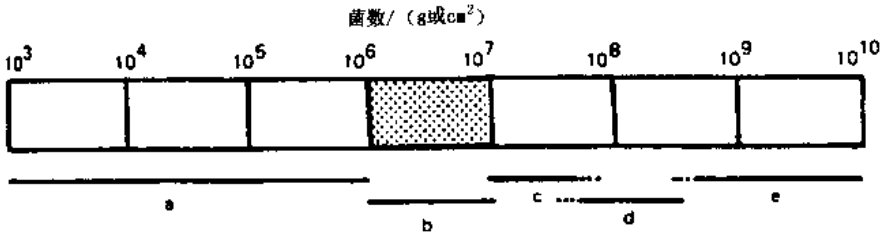


图 4.2 食品中总活菌数作为腐败标志的含义

a：在菌数 10^5~10^6 范围内，除了生牛乳一般不认为微生物腐败。

b：在此范围内一些食品表现为腐败初期。真空包装肉通常释放有害气体并可能腐败。

c：臭气通常与有氧保存的肉和一些蔬菜有关。

d：几乎所有食品都有腐败的明显标志。黏性物在有氧保存的肉上普遍存在。

e：在此阶段食品中出现限定的结构变化。

用抗菌素作为保护剂，或由于长时间冷冻细菌正常的数量已经减少。碎牛肉腐败的早期迹象是出现臭味，随后是意味着细菌黏性物质产生的胶黏性。胶黏性的产生是由于大量细菌生长和肉组织蛋白的松散和软化。

尽管掺入大豆的碎肉腐败的速率更快，但它的腐败方式与未掺入大豆的碎肉的腐败方式没有多大不同。

现在，人们还不很清楚腐败微生物在导致肉腐败中的确切作用，但此方面的研究也已取得了明显的进步。关于肉类腐败机制的早期研究包括许多检测技术（表 4.6）。

表 4.6 在肉、禽和水产品中确定微生物腐败的一些方法

化学方法		
a. 检测 H_2S 的产生	h. 确定易挥发减少的物质	o. 确定染色-还原能力
b. 检测硫醇的产生	i. 确定氨基氮	p. 测定次黄嘌呤
c. 确定不可凝性氮	j. 确定生化需氧量	q. 测定 ATP
d. 确定二甲胺和三甲胺	k. 确定硝酸盐还原作用	r. 放射法测定 CO_2
e. 确定酪氨酸复合体	l. 检测总氮	s. 乙醇产生（鱼腐败）
f. 确定吲哚和 3 甲基吲哚	m. 测定过氧化氢酶	t. 测定乳酸
g. 确定氨基酸	n. 确定肌酸苷含量	u. 颜色变化

物理方法	直接的细菌学方法	生理化学方法
a. 测定 pH 变化	a. 确定总需氧菌	a. 确定浸出物释放量
b. 测定肌肉汁折射率	b. 确定总厌氧菌	b. 确定保水性
c. 确定导电能力的改变	c. 确定总需氧菌和总厌氧菌的比率	c. 确定黏度
d. 确定表面张力	d. 确定在不同温度下以上方法中的一个或更多	d. 确定肉产味能力
e. 测定紫外照明（荧光）	e. 确定革兰氏阴性菌内毒素	
f. 确定表面传递		
g. 确定冰点特性		
h. 阻遏改变		
i. 热量		

4.4.1 机理

可以认为确定肉类腐败的可靠方法应是以腐败的原因和机理为基础。表 4.6 中列出的化学方法就证明了这种推测。当肉腐败时，一些可利用的基质被消耗，或腐败微生物菌群产生了一些新的产物。无可置疑，伴随着肉在低温下的腐败，诸如氨、H_2S、吲哚和胺的脱臭化合物产生。利用这些方法确定腐败的困难在于并非所有腐败微生物都会产生这些化合物。有一些方法错误地表明：伴随着低温腐败，主要的蛋白质会遭到破坏[52]。物理的和直接的细菌学方法就可清楚地表明：根据感观特性（气味，感觉，表观和味道）可以确定肉是否腐败。由某人来预测肉的腐败或有效保存期并不准确，而这应该由肉的新鲜性实验来确定。

肉腐败的代谢副产物中，将二胺基戊二胺和丁二胺作为肉腐败的指示剂来进行研究。这些二胺是以如下的方式形成：

$$\text{赖氨酸}\xrightarrow{\text{脱羧酶}}H_2N(CH_2)_5NH_2\ \text{（戊二胺）}$$

$$\text{鸟氨酸或精氨酸}\xrightarrow{\text{脱羧酶}}H_2N(CH_2)_4NH_2\ \text{（丁二胺）}$$

人们研究了二胺作为真空包装牛肉在 1℃保存 8 星期的质量指示[25]。在真空包装的肉中，戊二胺比丁二胺的量更多，而在有氧保存样品中其结果相反。经过培养，戊二胺水平比总体数值为 $10^6/cm^2$ 的最初水平高 10 倍，而丁二胺水平没什么变化。在总体上，这些研究结果表明这些二胺能够作为真空包装肉制品质量的评价标准。在新鲜牛肉、猪肉和羊肉中，丁二胺水平范围为 0.4～2.3μg/g，戊二胺水平范围为 0.1～1.3μg/g[26,81,112]。丁二胺是假单孢菌的主要二胺产物，而肠道菌产生较多的戊二胺[102]。从表 4.7 中可以看出在一个于 5℃保存 4d 的自然染菌牛肉样品中丁二胺从 1.2 升高到 26.1μg/g；而戊二胺水平却低得多。在另一个样品中，在同样条件下两种二胺都升高到较高的水平。在一项研究中，戊二胺是惟一同碎牛肉中大肠菌群有关的胺[94]。直到好氧平板计数（APC）超过 4×10^7，牛肉中才会出现丁二胺和戊二胺的显著变化[26]，由此可以提出利用它们来预测肉腐败的问题。这是一个同若干或单一代谢产物有普遍联系的问题，因为这些产物及产物浓度常与特定的微生物有关。

表 4.7　　在 5℃保存的自然染菌的碎牛肉上微生物数量和二胺浓度[26]

样品[a]	储藏时间/d	丁二胺[b] /（μg/g）	戊二胺[b] /（μg/g）	肠道菌科 /（lg 细菌数/g）	好氧平板菌数 /（lg 细菌数/g）
E	0	1.2	0.1	3.81	6.29
	1	1.8	0.1	3.56	7.66
	2	4.2	0.5	4.57	8.49
	3	10.0	0.5	5.86	9.48
	4	26.1	0.6	7.54	9.97
F	0	2.3	1.3	6.18	7.49
	1	3.9	4.5	6.23	7.85

续表

样品[a]	储藏时间/d	丁二胺[b] /（μg/g）	戊二胺[b] /（μg/g）	肠道菌科 /（lg 细菌数/g）	好氧平板菌数 /（lg 细菌数/g）
	2	12.1	17.9	6.69	8.73
	3	29.9	35.2	7.94	9.69
	4	59.2	40.8	9.00	9.91

注：资料来源 Edwards 等人（26），copyright ©1983，Blackwell Scientific Publications，Ltd。

[a] 样品 E 和 F 来自于两个不同的零售处。

[b] 二胺的量为两次测定的平均值。

1964 年报道的浸出物释放量（ERV）技术已经明确被用作一种评价标准来确定肉的初期腐败以及预测冷藏制品的有效保存期[51]。这个技术以牛肉均匀混合物释放出的水状萃取物在给定时间内通过滤纸过滤的量为基础。按照这种方法，感官特性和微生物特性较好的牛肉释放出大量的萃取物，而微生物特性差的牛肉释放出少量或根本没有萃取物（图 4.3）。尤为重要的是这种方法可以用于研究低温下牛肉的腐败机理。

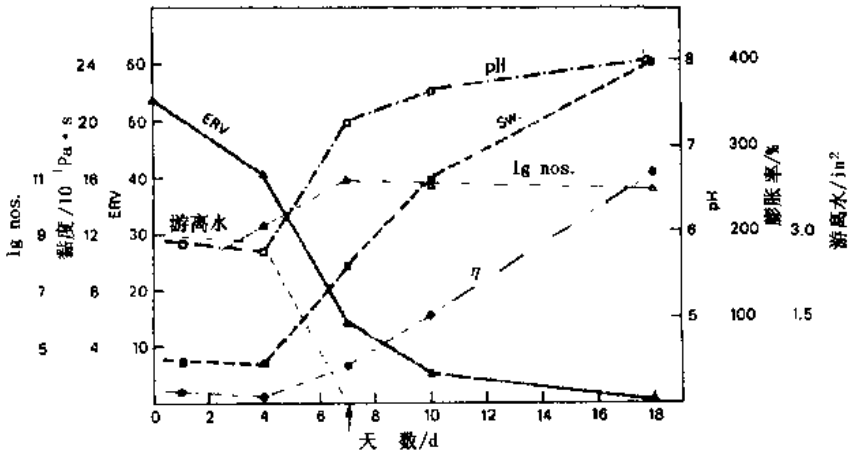


图 4.3 在 7℃保存新鲜碎牛肉直至发生限定腐败时几种生理化学肉腐败试验的特性曲线[96]

箭头指示检测到臭气的第一天。

ERV=浸出物释放量；游离水（Free H_2O）=测定保水性（相反关系）；

S_w=肉膨胀率；η=黏度；lg nos.=总好氧菌数/g

注：摘自 Shelef 和 Jay（98）Copyright ©1969，Institute of Food Technologists。

考察肉类腐败的 ERV 方法显示出腐败机制的两个方面。首先，在主要蛋白质没有显著破坏——至少没有完全破坏的情况下，才会发生低温下肉的腐败。尽管通过分析新鲜的和腐败的肉的总体蛋白质证实了这个事实，但只有使用这个方法才会发现这个规律，这也就是，当肉发生微生物腐败时，ERV 下降而不是上升，并且只有在蛋白质完全水解这种情况下才会发生。由 ERV 所揭示的肉腐败机制的第二个方面是通过一些目前尚不清楚的机制，肉蛋白的水合能力提高，在这一过程中腐败微生物产生的氨基糖复合体也发挥了一些作用[99]。在没有完全破坏蛋白质的情况下，腐败微生物怎样获得它们赖以生存

的营养仍是一个问题。

鲜肉在冷藏温度下保存时，在特定温度下能够生长的微生物开始生长。对于鲜肉，最终 pH 约为 5.6，丰富的葡萄糖和其他简单碳水化合物维持大约 $10^8/cm^2$ 的微生物生长[36]。在鲜肉中分布不均的微生物中，在冷藏温度下利用葡萄糖并且长得最快的微生物是假单孢菌，而可利用的表面的氧气会限制性地影响它们的生长[38]。热杀索丝菌也利用葡萄糖和谷氨酸盐，但由于它生长较缓慢，很难与假单孢菌竞争。当表面菌体浓度达到大约 $10^8/cm^2$ 时，已耗尽可利用的简单的碳水化合物，此时或许会产生脱臭，而这取决于自由氨基酸的利用程度。一旦简单的碳水化合物已消耗尽，假单孢菌和诸如莫拉氏菌、产碱杆菌、产气单孢菌、赛氏杆菌和泛菌的革兰氏阴性嗜冷细菌便利用自由氨基酸和相关的简单含氮化合物作为能量来源。不动杆菌首先利用氨基酸，其次是乳酸，当 pH 低于或等于 5.7 时，它们的生长减弱[38]。在家禽中，葡萄糖转变成葡萄糖酸盐似乎更有利于假单孢菌生长[56]。

通常由腐肉产生的臭味主要来自于游离氨基酸和相关的化合物（H_2S 来自于含硫氨基酸，NH_3 来自于许多氨基酸，吲哚来自于色氨酸）。只有开始利用氨基酸时，臭气才会产生（见下文）。在暗色、硬化和干燥（DFD）的肉中，最终 pH＞6.0 并且可利用简单碳水化合物相当的少，腐败则更迅速，细胞数量达到大约 $10^6/cm^2$ 就会产生臭味[82]。在普通或 DFD 肉中，直到可利用的简单组分已消耗尽，主要蛋白质才被破坏。例如，在发生低温腐败的通常条件下，盐溶牛肉蛋白抗原不会遭到破坏[71]。

至于鱼的腐败，从生鱼中压出汁液就可以从不同方面表明鱼已经腐败，通过检测整条鱼可以确定鱼的腐败情况[66]。在过滤的压榨汁液中很少有可溶性蛋白质，因此可以认为鱼腐败微生物群落一般很少破坏可溶性蛋白质。

对于牛肉和相关肉类这似乎同样正确。初期腐败常伴随着 pH 上升，细菌数量增加，肉蛋白水合能力增强，以及其他变化。在碎牛肉中，腐肉的 pH 可以升高到 8.5，而在腐败初期，肉的 pH 只有 6.5 左右[100]。通过绘制腐败微生物的生长曲线，可以观察到不同的生长阶段，其中下降的阶段可能表示大多数微生物耗尽营养物质以及细菌代谢的有毒副产物的积累。在低温卜肉中主要蛋白质到底是怎样被破坏的还不很清楚。详见参考文献[52]。

Dainty 等人[17]接种牛肉黏性物质到生牛肉片上并在 5℃进行培养。7d 后就产生臭味及黏性物质，微生物数量达 $2\times10^9/cm^2$。在牛肉片的肌浆或肌原纤维部分没有发生蛋白质水解作用。2d 后，肌浆部分没有任何变化，此时细菌数量达到 $10^{10}/cm^2$。这时一条新带的出现以及其他部分软化说明肌原纤维蛋白质遭到破坏。11d 后所有的肌原纤维带消失，肌浆部分的一些带开始软化。自然染菌的牛肉中，12d 后当细菌数量为 $4\times10^8/cm^2$ 时，可首次发现气味和黏性物质。经过 18d 肌原纤维蛋白没有变化。通过进行纯培养研究，这些研究者说明 Shewan 组 I 假单孢菌（见附录，Shewan 计划图 C）积极破坏肌原纤维蛋白，而对于肌浆组 II 假单孢菌更活跃。产气单孢菌对肌原纤维和肌浆蛋白都很活跃。在纯培养过程中，直到细菌数量达到 $3.2\times10^9/cm^2$，蛋白质才发生变化。此前，Borton 等人[11]曾指出莓实假单孢菌（一种组 II 假单孢菌）接种猪肉肌肉组织会影响蛋白质带的消失，但他们没有说明造成这种结果的最小微生物数量。

4.5 新鲜肝脏的腐败

人们对牛、猪和羊的肝脏腐败的情况不如对肉的情况了解得多。表 4.8 中列出了 10 份新鲜羊肝样品的碳水化合物、NH_3 和 pH 的平均值[37]。在相对高的碳水化合物含量和平均 pH6.41 的基础上，这些样品可能进行一种发酵性的腐败过程，pH 将会降到 6.0 以下。如果将肝脏粉碎或切成方块形并在冷藏温度下保存，这个现象将会发生。人们已进行了许多关于肝脏的研究，并认为菌体在这些肝脏表面生长，这些菌体来自于液滴或深层组织。在一项对方块形牛肝的腐败的研究中，在 5℃保存 7～10d 后，pH 由起始的 6.3 降至 5.9，在腐败过程中菌群主要由乳酸菌组成[97]。在其他的大量研究中，在腐败中占优势的微生物菌群也由同样的微生物组成，而在肌肉腐败中它们也占主要地位。在这项研究中，将猪肝在 5℃保存 7d，产生的主要微生物为假单孢菌、产碱杆菌、埃希氏杆菌、乳酸链球菌和热杀索丝菌[35]。将 5 个牛肝样品在 2℃保存 14d，腐败微生物菌群中的假单孢菌组成由 7%升至 100%，而在 14d 中平均 pH 由起始的 6.49 降至 5.93[47]。在另一项对牛、猪和羊的肝脏的研究中，2℃条件下保存 5d 后 3 种肝脏制品中主要微生物菌群发生变化，牛肝中主要微生物为链球菌、酵母、棒杆菌和假单孢菌；羊肝中主要为棒杆菌、小球菌和链球菌；猪肝中主要为葡萄球菌、莫拉氏不动杆菌和链球菌[46]。保存后 3 种肝样品的起始平均 pH 都下降，但幅度很小。由 Gill 和 Delacy[37]进行的羊肝腐败的研究中，表面腐败微生物菌群主要为假单孢菌、不动杆菌和肠球菌；来自肝脏的液滴主要含有假单孢菌和肠细菌；而在深层组织中主要微生物为肠细菌和乳酸杆菌。在这项研究中，用抗菌素处理的样品的起始 pH 由 6.4 左右降至 5.7 左右，这表明在微生物较少的情况下肝脏的糖酵解作用会引起 pH 下降，这些样品中只含有$<10^4/cm^2$ 的微生物数量。在产生臭味之前，高葡萄糖水平可以满足可见的表面菌落生长，这可以说明肝脏中的主要腐败微生物为非乳酸菌类型。

表 4.8　　10 个新鲜肝脏样品的 pH 和糖原、葡萄糖、乳酸和氨的浓度

成　分	平均浓度和范围
葡萄糖	2.73 (0.68～6.33) mg/g
糖原	2.98 (0.70～5.43) mg/g
乳酸	4.14 (3.42～5.87) mg/g
氨	7.52 (6.44～8.30) μmol/g
pH	6.41 (6.26～6.63)

注：摘自 Gill 和 Delacy (37)，copyright ©1983，American Society for Microbiology。

由于许多嗜冷的氧化性革兰氏阴性细菌比乳酸发酵革兰氏阳性菌生长更快并且更适于表面 Eh 较高的条件，因此可以料想在整个肝脏腐败中它们将占主要地位。较高的碳水化合物浓度会延迟这些微生物对氨基酸的利用，这在一定程度上说明了为什么在整个肝

脏腐败过程中 pH 不会上升，正如肉腐败的情况。就这方面而言，由于整个样品表面微生物群落重新分布，样品中的高碳水化合物含量有利于产乳酸微生物生长并会降低表面 Eh，因此可以料想粉碎的肝脏会有利于乳酸菌生长。在肝脏中，只有当条件不适于细菌生长时，生长缓慢的酵母和霉菌才开始生长，这在一定程度上类似于肉表面腐败的情况。除非采取特殊措施来抑制细菌生长，否则在新鲜碎肉的腐败中真菌从来不会占主要地位。根据这种相似性，在整个肝脏腐败中乳酸菌并不显著，因为条件更有利于生长快速、嗜冷的革兰氏阴性细菌生长。

4.6 鲜禽中微生物存在的偶然性和普遍性

整只家禽比切开的家禽似乎含有更少的微生物。这些制品上的微生物大多存在于表面，因此用“表面菌数/cm^2”表示通常比表示为表面和深层组织上的菌数更能说明问题。May[78]已说明在连续加工过程中鸡肉表面微生物数量是怎样增长起来的。在一项对来自六个商业性加工厂的整鸡肉的研究中，最初的平均总表面菌数为 lg3.30/cm^2。鸡被切开后，平均总菌数增至 lg3.81，而在包装后增至 lg4.08。运送这些禽制品的传送带中微生物数量为 lg4.76/cm^2。当在五个零售食品商店中进行同样步骤的检测时，May 发现整鸡在切开前平均菌数为 lg3.18，在切开并包装后菌数增至 lg4.06。切肉的砧板中微生物总菌数为 lg4.68/cm^2。

Cox 等人[11]研究了在家禽冷却的不同阶段中肠道细菌的变化情况。冷却前胴体中微生物的 APC 为 lg3.17/cm^2，肠道菌的为 lg2.27/cm^2。面冷却后，肠道菌的 APC 减少得更多。刚开始 85%的肠杆菌由埃希氏杆菌组成，但在 4℃保存 10d 后，它们降至 14%，而在同样的时间内肠道菌由 6%增至 88%。

对于人类，家禽是带来沙门氏菌的一个主要食物来源。对 50 个冷冻的碎火鸡肉样品进行检测，38%含有沙门氏菌[43]。Woodburn[111]研究了在烘焙-油炸鸡肉中沙门氏菌的存在情况。在 264 个禽制品中有 72 个（27%）含有代表 13 个变型血清的沙门氏菌。在变型血清中，婴儿链球菌、雷丁沙门氏菌和布洛克兰沙门氏菌最为普遍。在进一步加工之前，208 个火鸡胴体中有 24 个（11.5%）样品可从表面分离出沙门氏菌[12]。在加工成未熟的卷状制品之后，336 个样品中有 90 个（26.8%）含有沙门氏菌。在加工厂中，24%的加工机器带有沙门氏菌。大约三分之一的工人的手和手套上带有微生物。在恢复的 23 个变型血清中，可经常得到圣地亚哥沙门氏菌和鸭沙门氏菌。另一组研究者发现，在新鲜的碎火鸡肉中，75 个样品中有 28%含有沙门氏菌[42]。几乎一半样品含有总菌数高于 lg7.00/g 的微生物。带菌样品中有 99%含有大肠菌群，41%含有大肠杆菌，52%含有产气荚膜杆菌，69%含有金黄色葡萄球菌。通过最大可能菌数方法，在 101 个鸡肉样品中大约有 14%的样品含有粪便大肠菌群。

在鸡肉制品中空肠弯曲杆菌比沙门氏菌少。研究表明：火鸡的蛋和刚孵出的火鸡幼禽中没有这种微生物[2]。孵化后大约两个星期，在一间孵化室中有 76%的雏鸡粪便样品呈阳性。在冷冻制品的表面或液滴中不能分离出微生物，批发或零售的解冻的火鸡胴体及沸水冲洗和清洗胴体的步骤似乎是造成染菌的主要原因[1]。

各种熟的禽制品中，预煮的火鸡卷含有较少的微生物数量（表 4.9）。对 118 个烤焙制品进行检验，有 2.6%的样品含有产气荚膜杆菌[67]。

表 4.9 火鸡肉制品的微生物性质

产品	样品数	微生物组/指标	达标样品比率/%	参考文献
预煮火鸡卷	6	APC lg3.00/g	100	79
	6	大肠菌群 lg2.00（或更低）/g	67	79
	6	肠球菌 lg2.00（或更低）/g	83	79
	18	存在沙门氏菌	4	79
	48	存在产气荚膜杆菌	0	79
预煮火鸡卷	30	APC<lg2.00/g	20	113
火鸡肉片	29	存在大肠菌群	21	113
	29	存在大肠杆菌或沙门氏菌	0	113
碎新鲜火鸡肉	74	APC lg7.00（或更低）/g	51	42
	75	存在大肠菌群	99	42
	75	存在大肠杆菌	41	42
	75	存在“粪链球菌”	95	42
	75	存在金黄色葡萄球菌	69	42
	75	存在沙门氏菌	28	42
冷冻碎火鸡肉	50	APC（32℃）$<10^6$/g	54	43
	50	嗜冷菌$<10^6$ g	32	43
	50	MPN 大肠杆菌<10/g	80	43
	50	MPN 金黄色葡萄球菌<10/g	94	43
	50	MPN“粪链球菌”<10/g	54	43

注：APC=好氧平板菌数；MPN=最大可能数量。

新鲜家禽中的微生物群落主要由假单孢菌和其他密切相关的革兰氏阴性菌，以及棒杆菌，酵母和其他微生物组成。

4.7 家禽的微生物腐败

许多研究者对新鲜家禽中细菌群落的研究发现：新鲜家禽中会产生 25 种以上微生物（表 4.1）。然而，当这些禽肉发生低温腐败时，几乎全体研究者都一致认同主要腐败微生物属于假单孢菌属。在一项对鸡胴体中分离出的 5920 株微生物的研究中[52]，假单孢菌占 30.5%，不动杆菌占 22.7%，黄杆菌占 13.9%，棒状杆菌占 12.7%，酵母、肠道菌和其他微生物数量较少。在假单孢菌中，这些研究者发现在 King 培养基上有 61.8%的菌株具有荧光性并且 95.2%的假单孢菌可氧化葡萄糖。Barnes 和 Impey[8]发现了腐败家禽上的

假单孢菌的一个重要特性，他们指出在从开始保存到产生强烈臭味的过程中有色假单孢菌（Shewan 的组Ⅰ）数量从 34%降到 16%，而无色假单孢菌却从 11%升至 58%。伴随着类型Ⅰ假单孢菌，不动杆菌和其他细菌数量逐渐减少。在腐鱼中会发生与此类似的情况。

家禽腐败除非利用抗菌素来抑制细菌生长，一般真菌生长较差，而使用抗菌素后，霉菌则成为主要腐败微生物。家禽中假丝酵母、红酵母和“圆酵母”是最重要的酵母（表 4.2）。家禽腐败的显著特征是在胴体或肉块的外表面上有黏性。内脏空腔通常有酸味或发生通常称为内脏变质的现象。这种现象常见于纽约禽胴体的腐败，其内脏是留在体内的。这里的致病微生物除了前而所提到的细菌类外，还有肠球菌。

家禽腐败主要局限于胴体表面的主要原因如下所述：家禽的内部组织通常是无菌的，或含有较少的微生物，而在低温下这些微生物一般不生长。因此，腐败微生物菌落局限于表面并在从水中及加工处理过程中沉积下来的地方隐藏起来。在高湿度的环境中保存的新鲜家禽的表面很可能有如假单孢菌的好氧细菌生长。在家禽表而，这些微生物生长很好，并形成小的菌落，随后菌落聚结形成腐败家禽的黏性物质。May 等人[73]指出家禽表皮比肌肉组织更有利于家禽腐败微生物生长。在家禽几乎完全腐败的时候，由于产生大量荧光性假单孢菌，当用紫外光照射时家禽表面常会出现荧光。可直接从黏性物质中分离表面腐败微生物并在平板上恢复培养，或在载玻片上涂片黏性物质进行直接观察。通过革兰氏染色，可以看到与上文所提到的微生物一致的现象。四氮唑（2,3,5-氯化三苯基四氮唑）也可评价家禽表面的微生物的活性。当用这种化合物喷涂除去内脏的胴体时，微生物活性高的地方会出现红色。这些地方通常为切开的肌肉表而和诸如皮毛滤泡的其他受损伤的地方[86]。

当家禽发生腐败时，通常在黏性物质出现前先产生臭味，当微生物数量约为 $lg7.2/cm^2$ 至 $lg8.0/cm^2$ 时，会首先发现臭味。通常在臭味出现后不久黏性物质出现，此时微生物数量约为 $lg8/cm^2$[6]。黏性表面的总好氧微生物数量很少高于 $lg9.5/cm^2$。在开始阶段微生物只在家禽表而生长，在一段时间内还没有细菌侵人皮下组织。随后，细菌逐渐开始进入深层组织，引起肌肉蛋白水合作用增强，正如牛肉中所发生的情况一样。在家禽内部组织腐败中自溶作用是否起重要作用还不清楚。

真空包装和 CO_2 气体保存可以有效延迟家禽腐败。在 5℃将切开的生禽肉分别保存在 O_2 可透性膜中，真空包装，及保存在充 CO_2 高隔绝 O_2 的膜中，相应的保存时间分别为不多于 9d，9～11d 和 17d[110]。

在 5℃腐败希瓦氏菌在鸡肉中生长较好并在 7d 内产生臭气[76]。在通常产生气味的微生物中，新鲜家禽上只存在有限的产生特定气味的微生物类型[74]。研究采用鸡胸肌肉为样品，其腐败方式与腿部肌肉不同是因为后者 pH 较高。将鸡腿肉在 2℃保存 16d，微生物群落中 47%为组Ⅰ型假单孢菌，32%为组Ⅱ型，17%为莫拉氏不动杆菌，4%为腐败希瓦氏菌[75]。后者的全部分离微生物产生类似于硫化物的气味，而这种微生物除产生 H_2S 外，还有甲烷硫醇和二甲硫。在鸡胸肉的腐败中这种现象并不显著。由于 Shewan 的组Ⅰ假单孢菌比产色素的组Ⅰ菌株生长更快，因此能够产生强烈气味似乎是这些菌株的特性。组Ⅱ假单孢菌能够消耗鸡皮中的游离氨基酸，而组Ⅰ型菌影响游离氨基酸数量的增加并

且其生长还与含氮化合物有关[3]。

当纽约禽胴体发生微生物腐败时，微生物通过肠壁侵入肠内腔的内部组织。这种类型的家禽腐败的显著特性与“内脏变质”有关。

4.8 屠宰后动物胴体的清洗和消毒

动物外表面在屠宰之前带有灰尘、污垢以及粪便等。来源于这些的微生物不可避免地存在于屠宰后动物胴体上，尽管许多微生物是非致病菌，但病菌也可能存在。为了尽量减少分割胴体和终产品上的致病菌的数量和种类，人们采用了清洗，喷洒和/或消毒等措施。

总的来讲，利用浓度为2%～7%的诸如乙酸、乳酸和柠檬酸的有机酸会带来不同的效果。在一项研究中，乳酸比乙酸更能有效地减少大肠杆菌0157：H7的数量，但对于沙门氏菌两者差不多[48]。人们似乎一致认为从脂肪中比从瘦肉中更难排除微生物。在除去毛皮后，立即进行开膛前的清洗（此时胴体具有较高的pH，黏性表面和较高的水合能力），这样可以降低微生物附着在胴体表面的能力，随后是开膛后清洗[19]。虽然清洗和喷淋胴体可以从整体上减少微生物总数，但这些处理方法不能保证肉中不带有致病菌[20]。用水喷淋冲洗除去可见的粪便污物可以使微生物数量减少1～2lgcfu/cm^2[41]。此后，研究者发现喷淋压力是一个重要参数并建议其最大值为2.07MPa。有机酸喷淋可以减少1～2lgcfu/cm^2，在一项研究中，对于大肠杆菌0157：H7，5%的酸很有效，但无法将微生物数量减少到零[57]。

通过机械处理可见的固体区域可以减少一些微生物，但这种方法会导致经济损失而且还不能确定利益是否大于损失。在一项对牛胴体的股肉的研究中，用三种方法处理后的平均lg平板数量/cm^2如下：无机械修整、无清洗，3.5；无机械修整只清洗，3.2；只机械修整不清洗，0.5[87]。研究者发现在这个可控制的研究中，联合使用机械修整和清洗所减少的微生物数量最多，但用不能旋转或不干净的刀进行机械修整通常会造成不良的结果。在另一项研究中，237个带有可见粪便污物的牛胴体和猪胴体样品中微生物数平均lgcfu/cm^2为4.5，而169个无可见粪便污物的样品中微生物平均数lgcfu/cm^2为2.8[101]。研究者发现22个正在加工的牛胴体样品在45s内开膛其APC范围为小于0.1～0.6 lgcfu/cm^2。

牛胴体上的大肠菌群的lgcfu/cm^2范围为0.3～0.4，而大肠杆菌的为0.04～0.2[87]。在家禽的机械去毛过程中，与凝结酶阴性葡萄球菌不同，在机械上未发现大肠杆菌的菌落[74]。胴体上的主要葡萄球菌起初为木糖葡萄球菌和模仿葡萄球菌，但随后会被在去毛机械上占优势的松鼠葡萄球菌所取代。

参 考 文 献

[1] Acuff, G. R., C. Vanderzant, M. O. Hanna, J. G. Ehlers, F. A. Golan, and F. A. Gardner. 1986. Prevalence of *Campylobacter jejuni* in turkey carcass processing and further processing of

turkey products. *J. Food Protect.* 49: 712～717.

[2] Acuff, G. R., C. Vanderzant, F. A. Gardner, and F. A. Golan. 1982. Examination of turkey eggs, poults, and brooder house facilities for *Campylobacter jejuni*. *J. Food Protect.* 45: 1279～1281.

[3] Adamcic, M., D. S. Clark, and M. Yaguchi. 1970. Effect of psychrotolerant bacteria on the amino acid content of chicken skin. *J. Food Sci.* 35: 272～275.

[4] Andrews, W. H., A. P. Duran, F. D. McClure, and D. E. Gentile. 1979. Use of two rapid A1 methods for recovery of fecal coliforms and *Escherichia coli* from selected food types. *J. Food Sci.* 44: 289～291, 293.

[5] Ayres, J. C. 1960. The relationship of organisms of the genus *Pseudomonas* to the spoilage of meat, poultry and eggs. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 471～486.

[6] Ayres, J. C., W. S. Ogilvy, and G. F. Stewart. 1950. Post mortem changes in stored meats. I. Microorganisms associated with development of slime on eviscerated cut-up poultry. *Food Technol.* 4: 199～205.

[7] Barbe, C. D., R. W. Mandigo, and R. L. Henrickson. 1966. Bacterial Hora associated with rapid-processed ham. *J. Food Sci.* 31: 988～993.

[8] Barnes, E. M., and C. S. Impey. 1968. Psychrophilic spoilage bacteria of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 97～107.

[9] Bauer, F. T., J. A. Carpenter, and J. O. Reagan. 1981. Prevalence of *Clostridium perfringens* in pork during processing. *J. Food Protect.* 44: 279～283.

[10] Bell, W. N., and L. A. Shelef. 1978. Availability and microbial stability of retail beef-soy blends. *J. Food Sci.* 43: 315～318, 333.

[11] Borton, R. J., L. J. Bratzler, and J. F. Price. 1970. Effects of four species of bacteria on porcine muscle. 2. Electrophoretic patterns of extracts of salt-soluble protein. *J. Food Sci.* 35: 783～786.

[12] Bryan, F. L. 1983. Epidemiology of milk-borne diseases. *J. Food Protect.* 46: 637～649.

[13] Carl. K. E. 1975. Oregon's experience with microbiological standards for meat. *J. Milk Food Technol.* 38: 483～486.

[14] Cox, N. A., A. J. Mercuri, B. J. Juven, and J. E. Thomson. 1975. *Enterobacteriaceae* at various stages of poultry chilling. *J. Food Sci.* 40: 44～46.

[15] Craven, S. E., and A. J. Mercuri. 1977. Total aerobic and coliform counts in beef-soy and chicken-soy patties during refrigerated storage. *J. Food Protect.* 40: 112～115.

[16] Cutter, C. N., and G. R. Siragusa. 1994. Efficacy of organic acids against *Escherichia coli* 0157: H7 attached to beef carcass tissue using a pilot scale model carcass washer. *J. Food Protect.* 57: 97～103.

[17] Dainty, R. H., B. G. Shaw, K. A. DeBoer, and E. S. J. Scheps. 1975. Protein changes caused by bacterial growth on beef. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 73～81.

[18] Davidson, C. M., M. J. Dowdell, and R. G. Board. 1973. Properties of gram negative aerobes isolated from meats. *J. Food Sci.* 38: 303～305.

[19] Dickson, J. S. 1995. Susceptibility of preevisceration washed beef carcasses to contamination by *Escherichia coli* 0157: H7 and salmonellae. *J. Food Protecd.* 58: 1065～1068.

[20] Dickson, J. S., and M. E. Anderson. 1992. Microbiological decontamination of food animal carcasses

by washing and sanitizing systems: A review. *J. Food Protect.* 55: 133～140.

[21] Dillon, V. M., and R. G. Board. 1991. Yeasts associated with red meats. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 93～108.

[22] Draughon, F. A. 1980. Effect of plant-derived extenders on microbiological stability of foods. *Food Technol.* 34 (10): 69～74.

[23] Duitschaever, C. L., D. H. Bullock, and D. R. Arnott. 1977. Bacteriological evaluation of retail ground beef, frozen beef patties, and cooked hamburger. *J. Food Protect.* 40: 378～381.

[24] Dutson, T. R., G. C. Smith, and Z. L. Carpenter. 1980. Lysosomal enzyme distribution in electrically stimulated ovine muscle. *J. Food Sci.* 45: 1097～1098.

[25] Edwards, R. A., R. H. Dainty, and C. M. Hibbard. 1985. Putrescine and cadaverine formation in vacuum packed beef. *J. Appl. Bacteriol* 58: 13～19.

[26] Edwards, R. A., R. H. Dainty, and C. M. Hibbard. 1983. The relationship of bacterial numbers, and types of diamine concentration in fresh and aerobically stored beef, pork and lamb. *J. Food Technol.* 18: 777～788.

[27] Eribo, B. E., and J. M. Jay. 1985. Incidence of *Acinetobacter* spp. and other gram-negative, oxidase-negative bacteria in fresh and spoiled ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 256～257.

[28] Eribo, B. E., S. D. Lall, and J. M. Jay. 1985. Incidence of *Moraxella* and other gram-negative, oxidase-positive bacteria in fresh and spoiled ground beef. *Food Microbiol.* 2: 237～240.

[29] Field, R. A. 1976. Mechanically deboned red meat. *Food Technol.* 30 (9): 38～48.

[30] Field R. A. 1981. Mechanically deboned red meat. *Adv. Food Res.* 27: 23～107.

[31] Field, R. A., and M. L. Riley. 1974. Characteristics of meat from mechanically deboned lamb breasts. *J. Food Sci.* 39: 851～852.

[32] Froning, G. W. 1981. Mechanical deboning of poultry and fish. *Adv. Food Res.* 27: 109～147.

[33] Fung, D. Y. C., C. L. Kastner. M. C. Hunt. M. E. Dikeman, and D. H. Kropf. 1980. Mesophilic and psychrotrophic bacterial populations on hot-boned and conventionally processed beef. *J. Food Protect.* 43: 547～550.

[34] Fung, D. Y. C., C. L. Kastner. C. -Y. Lee, M. C. Hunt, M. E. Dikeman, and D. H. Kropf. 1981. Initial chilling rate effects of bacterial growth on hot-boned beef. *J. Food Protect.* 44: 539～544.

[35] Gardner, G. A. 1971. A note on the aerobic microflora of fresh and frozen porcine liver stored at 5C. *J. Food Technol.* 6: 225～231.

[36] Gill, C. O. 1976. Substrate limitation of bacterial growth at meat surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 41: 401～410.

[37] Gill, C. O., and K. M. DeLacy. 1982. Microbial spoilage of whole sheep livers. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1262～1266.

[38] Gill, C. O., and K. G. Newton. 1977. The development of aerobic spoilage flora on meat stored at chill temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 189～195.

[39] Goepfert, J. M. 1977. Aerobic plate count and *Escherichia coli* determination on frozen ground-beef patties. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 458～460.

[40] Greenberg, R. A., R. B. Tompkin, B. O. Bladel, R. S. Kittaka, and A. Anellis. 1966. Incidence of mesophilic *Clostridium* spores in raw pork, beef, and chicken in processing plants in

the United States and Canada. *Appl. Microbiol.* 14: 789～793.

[41] Gorman, B. M., J. B. Morgan, J. N. Sofos, and G. C. Smith. 1995. Microbiological and visual effects of trimming and/or spray washing for removal of fecal material from beef. *J. Food Protect.* 58: 984～989.

[42] Guthertz, L. S., J. T. Fruin, R. L. Okoluk, and J. L. Fowler. 1977. Microbial quality of frozen comminuted turkey meat. *J. Food Sci.* 42: 1344～1347.

[43] Guthertz, L. S., J. T. Fruin, D. Spicer, and J. L. Fowler. 1976. Microbiology of fresh comminuted turkey meat, *J. Milk Food Technol.* 39: 823～829.

[44] Hanna, M. O., G. C. Smith, J. W. Savell, F. K. McKeith, and C. Vanderzant. 1982. Microbial flora of livers, kidneys and hearts from beef, pork and lamb: Effects of refrigeration, freezing and thawing. *J. Food Protect.* 45: 63～73.

[45] Hanna, M. O., G. C. Smith. J. W. Savell, F. K. McKeith, and C. Vanderzant. 1982. Effects of packaging methods on the microbial flora of livers and kidneys from beef of pork. *J. Food Protect.* 45: 74～81.

[46] Hanna, M. O., G. C. Smith, J. W. Savell, F. K. McKeith, and C. Vanderzant. 1982. Microbial flora of livers, kidneys and hearts from beef, pork, and lamb: Effects of refrigeration, freezing and thawing. *J. Food Protect.* 45: 63～73.

[47] Hanna, M. O., G. C. Smith, J. W. Savell, F. K. McKeith, and C. Vanderzant. 1982. Effects of packaging methods on the microbial flora of livers and kidneys from beef or pork. *J. Food Protect.* 45: 74～81.

[18] Hardin, M. D., G. R. Acuff, L. M. Lucia, J. S. Oman, and J. W. Savell. 1995. Comparison of methods for decontamination from beef carcass surfaces. *J. Food Protect.* 58: 368～374.

[49] Harrison, M. A., F. A. Draughton, and C. C. Melton. 1983. Inhibition of spoilage bacteria by acidification of soy extended ground beef. *J. Food Sci.* 48: 825～828.

[50] Hsieh, D. Y., and J. M. Jay. 1984. Characterization and identification of yeasts from fresh and spoiled ground beef. *Int. J. Food Microbiol.* 1: 141～147.

[51] Ingram, M., and R. H. Dainty. 1971. Changes caused by microbes in spoilage of meats. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 21～39.

[52] Jay, J. M., and L. A. Shelef. 1991. The effect of psychrotrophic bacteria on refrigerated meats. In *Biodeterioration and Biodegradation* 8. ed. H. W. Rossmoore, 147～159. London: Elsevier Applied Sciences.

[53] Jay, J. M. 1964. Beef microbial quality determined by extract-release volume (ERV). *Food Technol.* 18: 1637～1641.

[54] Jay, J. M. 1967. Nature, characteristics, and proteolytic properties of beef spoilage bacteria at low and high temperatures. *Appl. Microbiol.* 15: 943～944.

[55] Jay, J. M. 1987. Meats, poultry, and seafoods. In *Food and Beverage Mycology*, 2d ed., ed. L. R. Beuchat, chap. 5. New York: Van Nostrand Reinhold.

[56] Kakouri, A., and G. J. E. Nychas. 1994. Storage of poultry meat under modified atmospheres or vacuum packs: Possible role of microbial metabolites as indicator of spoilage. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 163～172.

[57] Kastner, C. L., L. O. Leudecke, and T. S. Russell. 1976. A comparison of microbial counts on conventionally and hot-boned carcasses. *J. Milk Food Technol.* 39: 684～685.

[58] Keeton, J. T., and C. C. Melton. 1978. Factors associated with microbial growth in ground beef extended with varying levels of textured soy protein. *J. Food Sci.* 43: 1125～1129.

[59] Kotula, A. W. 1981. Microbiology of hot-boned and electrostimulated meat. *J. Food Protect.* 44: 545～549.

[60] Kotula, A. W., and B. S. Emswiler-Rose. 1981. Bacteriological quality of hot-boned primal cuts from electrically stimulated beef carcasses. *J. Food Sci.* 46: 471～474.

[61] Ladiges, W. C., J. F. Foster, and W. M. Ganz. 1971. Incidence and viability of *Clostridium perfringens* in ground beef. *J. Milk Food Technol.* 37: 622～623.

[62] Lahellec, C., C. Meurier, and G. Bennejean. 1975. A study of 5920 strains of psychrotrophic bacteria isolated from chickens. *J. Appl. Bacteriol.* 38: 89～97.

[63] Lawrie, R. A. 1966. *Meat Science*. New York: Pergamon Press.

[64] Lee, C. Y., D. Y. C. Fung, and E. L. Kastner. 1982. Computer-assisted identification of bacteria on hot-boned and conventionally processed beef. *J. Food Sci.* 47: 363～367, 373.

[65] Lepovetsky, B. C., H. H. Weiser, and F. E. Deatherage. 1953. A microbiological study of lymph nodes, bone marrow and muscle tissue obtained from slaughtered cattle. *App. Microbiol.* 1: 57～59.

[66] Lerke, P., R. Adams, and L. Farber. 1963. Bacteriology of spoilage of fish muscle. I. Sterile press juice as a suitable experimental medium. *Appl. Microbiol.* 11: 158～462.

[67] Lillard, H. S. 1971. Occurrence of *Clostridium perfringens* in broiler processing and further processing operations. *J. Food Sci.* 36: 1008～1010.

[68] Lin, C. K., W. H. Kennick, W. E. Sandine, and M. Koohmaraie. 1981. Effect of electrical stimulation on meat microflora: Observations on agar media, in suspensions and on beef carcases. *J. Food Protect.* 17: 279～283.

[69] Lin, H. -S., D. G. Topel, and H. W. Walker. 1979. Influence of prerigor and postrigor muscle on the bacteriological and quality characteristics of pork sausage. *J. Food Sci.* 44: 1055～1057.

[70] Lowry, P. D., and C. O. Gill. 1984. Temperature and water activity minima for growth of spoilage moulds from meat. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 193～199.

[71] Margitic, S., and J. M. Jay. 1970. Antigenicity of salt-soluble beef muscle proteins held from freshness to spoilage at low temperatures. *J. Food Sci.* 35: 252～255.

[72] May, K. N. 1962. Bacterial contamination during cutting and packaging chicken in processing plants and retail stores. *Food Technol.* 16: 89～91.

[73] May, K. N., J. D. Irby, and J. L. Carmon. 1961. Shelf life and bacterial counts of excised poultry tissue. *Food Technol.* 16: 66～68.

[74] McMeekin, T. A. 1975. Spoilage association of chicken breast muscle. *Appl. Microbiol.* 29: 14～47.

[75] McMeekin, T. A. 1977. Spoilage association of chicken leg muscle. *Appl. Microbiol.* 33: 1244～1246.

[76] McMeekin, T. A., and J. T. Patterson. 1975. Characterization of hydrogen sulfide-producing bacteria isolated from meat and poultry plants. *Appl. Microbiol.* 29: 165～169.

[77] McMillin, D. J., J. G. Sebranek, and A. A. Kraft. 1981. Microbial quality of hot-processed frozen ground beef patties processed after various holding times. *J. Food Sci.* 46: 488～490.

[78] Mead, G. C., and M. J. Scott. 1994. Coagulase-negative staphylococci and coliform bacteria associated with mechanical defeathering of poultry carcasses. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 62～64.

[79] Mercuri, A. J., G. J. Banwart, J. A. Kinner, and A. R. Sessoms. 1970. Bacteriological examination of commercial precooked Eastern-type turkey rolls. *Appl. Microbiol.* 19: 768～771.

[80] Murthy, T. R. K. 1984. Relative numbers of coliforms, *Enterobacteriaceae* (by two methods), and total aerobic bacteria counts as determined from minced goat meat. *J. Food Protect.* 47: 142～144.

[81] Nakamura, M., Y. Wada, H. Sawaya, and T. Kawabata. 1979. Polyamine content in fresh and processed pork. *J. Food Sci.* 44: 515～517.

[82] Newton, K. G., and C. O. Gill. 1978. Storage quality of dark, firm, dry meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 375～376.

[83] Ockerman, H. W., and J. Szczawinski. 1983. Effect of electrical stimulation on the microflora of meat. *J. Food Sci.* 48: 1004～1005, 1007.

[84] Ostovar, K., J. H. MacNeil, and K. O'Donnell. 1971. Poultry product quality. 5. Microbiological evaluation of mechanically deboned poultry meat. *J. Food Sci.* 36: 1005～1007.

[85] Peel, J. L., and J. M. Gee. 1976. The role of micro-organisms in poultry taints. In *Microbiology in Agriculture, Fisheries and Food*, ed. F. A. Skinner and J. G. Carr, 151～160. New York: Academic Press.

[86] Pivnick, H., I. E. Erdman, D. Collins-Thompson, G. Roberts, M. A. Johnston, D. R., Conley, G. Lachapelle, U. T. Purvis, R. Foster, and M. Milling. 1976. Proposed microbiological standards for ground beef based on a Canadian survey. *J. Milk Food Technol.* 39: 408～412.

[87] Prasai, R. K., R. K. Phebus, C. M. Garcia Depeda, C. L. Kastner, A. E. Boyle, and D. Y. C. Fung. 1995. Effectiveness of trimming and/or washing on microbiological quality of beef carcasses. *J. Food Protect.* 58: 1114～1117.

[88] Prieto, M., M. R. Garcia-Armesto, M. I. Garcia-López, A. Otero, and B. Moreno. 1992. Numerical taxonomy of gram-negative, nonmotile, nonfermentative bacteria isolated during chilled storage of lamb carcasses. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2245～2249.

[89] Pulliam, J. D., and D. C. Kelley. 1965. Bacteriological comparisons of hot processed and normally processed hams. *J. Milk Food Technol.* 28: 285～286.

[90] Raccach, M., and R. C. Baker. 1978. Microbial properties of mechanically deboned fish flesh. *J. Food Sci.* 43: 1675～1677.

[91] Ray, B., and R. A. Field. 1983. Bacteriology of restructured lamb roasts made with mechanically deboned meat. *J. Food Protect.* 46: 26～28.

[92] Ray, B., C. Johnson, and R. A. Field. 1984. Growth of indicator, pathogenic and psychrotrophic bacteria in mechanically separated beef, lean ground beef and beef bone marrow. *J. Food Protect.* 47: 672～677.

[93] Rothenberg, C. A., B. W. Berry, and J. L. Oblinger. 1982. Microbiological characteristics of beef tongues and livers as affected by temperature-abuse and packaging systems. *J. Food Protect.* 45: 527～532.

[94] Sayem-El-Daher, N., and R. E. Simard. 1985. Putrefactive amine changes in relation to microbial counts of ground beef during storage. *J. Food Protect.* 48: 54～58.

[95] Shaw, B. G., and J. B. Latty. 1982. A numerical taxonomic study of *Pseudomonas* strains from spoiled meat. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 219～228.

[96] Shaw, B. G., and J. B. Latty. 1984. A study of the relative incidence of different *Pseudomonas*

groups on meat using a computer-assisted identification technique employing only carbon source tests. *J. Appl. Bacteriol.* 57: 59～67.

[97] Shelef, L. A. 1975. Microbial spoilage of fresh refrigerated beef liver. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 273～380.

[98] Shelef, L. A., and J. M. Jay. 1969. Relationship between meat-swelling, viscosity, extractrelease volume, and water-holding capacity in evaluating beef microbial quality. *J. Food Sci.* 34: 532～535.

[99] Shelef, L. A., and J. M. Jay. 1969. Relationship between amino sugars and meat microbial quality. *Appl. Microbiol.* 17: 931～932.

[100] Shelef, L. A., and J. M. Jay. 1970. Use of a titrimetric method to assess the bacterial spoilage of fresh beef. *Appl. Microbiol.* 19: 902～905.

[101] Siragusa, G. R., C. N. Cutter, W. J. Dorsa, and M. Koohmaraie. 1995. Use of a rapid microbial ATP bioluminescence assay to detect contamination on beef and pork carcasses. *J. Food Protect.* 58: 770～775.

[102] Slemr, J. 1981. Biogene Amine als potentieller chemischer Qualitatsindikator für Fleisch. *Fleischwirt.* 61: 921～925.

[103] Smith, F. C., R. A. Field, and J. C. Adams. 1974. Microbiology of Wyoming big game meat. *J. Milk Food Technol.* 37: 129～131.

[104] Steinkraus, K. H., and J. C. Ayres. 1964. Incidence of putrefactive anaerobic spores in meat. *J. Food Sci.* 29: 87～93.

[105] Stiles, M. E., and L. -K. Ng. 1981. Biochemical characteristics and identification of *Enterobacteriaceae* isolated from meats. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 639～645.

[106] Strong, D. H., J. C. Canada, and B. B. Griffiths. 1963. Incidence of *Clostridium perfringens* in American foods. *Appl. Microbiol.* 11: 42～44.

[107] Surkiewicz, B. F., M. E. Harris, R. P. Elliott, J. F. Macaluso, and M. M. Strand. 1975. Bacteriological survey of raw beef patties produced at establishments under federal inspection. *Appl. Microbiol.* 29: 331～334.

[108] Swartzentruber, A., A. H. Schwab, B. A. Wentz, A. P. Duran, and R. B. Read, Jr. 1984. Microbiological quality of biscuit dough, snack cakes and soy protein meat extender. *J. Food Protect.* 47: 467～470.

[109] Thomas, V. O., A. A. Kraft, R. E. Rust, and D. K. Hotchkiss. 1984. Effect of carbon dioxide flushing and packaging methods on the microbiology of packaged chicken. *J. Food Sci.* 49: 1367～1371.

[110] Watt, B. K., and A. L Merrill. 1950. Composition of foods - raw, processed, prepared. *Agricultural Handbook No.* 8. Washington, DC.: USDA.

[111] Woodburn, M. 1964. Incidence of Salmonellae in dressed broiler-fryer chickens. *Appl. Microbiol.* 12: 492～495.

[112] Yamamoto, S., H. Itano, H. Kataoka, and M. Makita. 1982. Gas-liquid chromatographic method for analysis of di-and polyamines in foods. *J. Agric. Food Chem.* 30: 435～439.

[113] Zottola, E. A., and F. F. Busta. 1971. Microbiological quality of further-processed turkey products. *J. Food Sci.* 36: 1001～1004.

5. 肉、禽制品

本部分内容所涉及的产品是指那些主要以延长货架寿命和增加风味为目的而进行加工的红色肉制品。尤其是指气调包装（MAP）和真空包装（VP）肉制品及一些诸如维也纳香肠和香肠等产品。

5.1 气调包装和真空包装

肉制品气调包装（MAP）生产工艺基本原理是：通过改变包装中某些特定气体的构成比例，从而达到抑制微生物生长的目的。MAP 生产工艺主要涉及的气体是 CO_2 和 O_2，通常是将 CO_2 的浓度提高，同时降低 O_2 的浓度。真空包装肉制品中也会发生 CO_2 浓度增高和 O_2 浓度降低的现象，但其浓度的变化范围没有气调包装那样大。例如：对在冷藏温度下贮存至少 1 个星期的真空包装肉制品，其包装中最高 CO_2 浓度大约是 30%。同时，O_2 浓度降至大约 5%。CO_2 浓度提高和 O_2 浓度降低的主要原因是微生物的呼吸作用。在 pH 大于 5.5 的情况下，肉组织中的线粒体呼吸作用也会对包装中的气体构成产生相同的影响。如果要达到超出上面所提的 CO_2 和 O_2 浓度水平，必须采用 MAP 生产工艺。

采用 MAP 生产工艺，气体通常与 N_2 或空气混合。对红色肉，要维持正常色泽，含一些 O_2 是必要的，然而即使 CO_2 浓度达 20%，对红色肉色泽也不会造成很大的影响。与此同时，在 MAP 肉中适量 O_2 的存在，可抑制或减缓厌氧菌的生长。为达到延长各类食品货架期的目的，对混合气体的比例已做了广泛的研究，实验控制的 CO_2 浓度范围在 10%～100%之间，N_2 和 O_2 的含量则随之变化。MAP 环境可按下列方法获得：

①将产品放入不透气的塑料袋中，在真空压力（1.3～99kPa）下将袋中空气抽空，通过浸入 80～90℃水中进行热收缩，热封。

②同上所述，但压出多余空气和热封。

③使用不透气的塑料袋，加入产品，用混合气体置换袋中气体（如需要，留顶隙），夹紧或热封。

④将产品置于罐内，用装配有带小孔橡胶塞的盖盖紧，用混合气体进行“置换”（主要用于实验操作）。

由于 MAP 和 VP（真空包装）的保藏性能主要来自于 CO_2 的作用结果，所以它们之间的微生物特性方面有较高的相似性。这些产品和新鲜肉在菌相上的主要差异性可由表 5.1 和表 5.2 与前章的表 4.1 和表 4.2 进行比较后得出。细菌菌相主要由革兰氏阳性菌组成，涉及的酵母菌较少。虽然 MAP 和 VP 的生产工艺将分别论述，但它们二者之间有很多相似之处。

表 5.1 肉禽产品中常见细菌种类

种类（属）	革兰氏反应	肉 产 品	VP 肉制品	腊 肉
不动细菌	-	×	×	×
气单胞菌	—		×	×
产碱杆菌	—			×
芽孢杆菌	+	×		×
环丝菌	+	×	××	
肉食杆菌	+		××	
棒状杆菌	+	×	×	×
肠细菌	—	×	×	
肠球菌	+	×	××	×
哈夫尼菌	+	×		
Kocuria	+	×	×	×
库特氏菌	+		×	
乳球菌	—	×		
乳杆菌	+	××	××	
明串珠菌	+	×	×	
李斯特菌	+	×		
小杆菌	+	×	×	×
小球菌	+	×	×	×
摩氏杆菌	—			×
Paenibacillus	+	×		×
足球菌	+	×	×	
假单胞菌	—		×	
赛氏杆菌	-	×	×	
葡萄球菌	+	×	×	×
孤菌	-			×
Weissella	+	×	×	
耶尔森氏菌	—		×	

注：×为检出过；××为检出异常频繁。

表 5.2 腊肉和肉制品中常见的酵母和霉菌种类

种 类	相对检出频率	种 类	相对检出频率
酵母			
假丝酵母	×	酵母属	×
德氏酵母	××	丝孢酵母	×

续表

种　类	相对检出频率	种　类	相对检出频率
霉菌			
交链孢霉	×	念珠霉	×
曲霉	××	毛霉	×
葡萄孢	×	青霉	××
芽枝霉	×	根霉	×
镰刀霉	×	帚霉	×
地霉	×	枝霉	×

注：×为检出过；××为频繁检出。

5.1.1 真空包装和 CO_2 的作用

据估计，在美国至少有 80%以上的新鲜牛肉是以真空包装形式出厂销售的，由于要求这种产品有较长的货架期，所以它的微生物指标是相当重要的。真空包装的过程是这样的：将肉放入塑料袋或盒中，用真空包装机抽去空气，然后将袋或盒密封，一般采用热封方式。从微生物角度看，这个过程最重要的意义在于改变包装中气体的成分。虽然密封前不可能将所有 O_2 抽掉，但一部分残存的 O_2 可被需氧菌和肉组织本身消耗，由此导致了 CO_2 比例的增加，CO_2 又会抑制菌的生长（见第二部分 3）。真空包装产品在贮存中，其袋内空隙中 O_2 和 CO_2 相对数量的多少主要取决于塑料袋阻碍这些气体相互渗透的能力。

大量的研究人员在研究后发现：在使用氧可透性的包装材料的情况下，冷藏肉会发生革兰氏阴性菌引起的腐败，并伴随着 pH 的升高和恶臭味的产生，而且在腐败菌菌相中假单胞菌为主导菌（见第三部分 4）。

研究表明：真空包装牛肉的保质期与包装薄膜的可透气性成反比，用“氧零透过”薄膜可使产品有最长的货架期（>15 周）。而使用高透气性薄膜〔920mL O_2/（m^2 · 24h · 0.1MPa），25℃，R.H100%〕包装的产品只有 2～4 周的货架期。随着薄膜透气性的增加，假单胞菌生长量增加[62]。另一方面，如果采用氧不可透性的包装材料，由于 CO_2 比例的增加和低的氧化-还原电位（Eh），有利于乳酸菌和热死环丝菌的生长[77,78,91]。这些菌的生长通常会使产品 pH 下降，形成一个对食物传染病原菌和革兰氏阴性菌不利的生长环境。接种有乳酸菌的真空包装牛肉在 5℃下经 24～35d 保藏后，其 pH 从原来的 5.45～5.65，下降至 5.30～5.45[25]。真空包装的午餐肉在 5℃下经 16d 保存后，在 LBS 琼脂上的平板计数结果基本等于在 APT 琼脂上的平板计数结果（APC），这表明其菌相基本上是由乳酸菌构成的[49]。经过 15 周后，产生的乳酸量可达 0.6%～0.8%，一些产品的 pH 可下降至<5.0。

对真空包装鲜肉而言，Henrg 等人[42]对真空包装羊肉排的研究结果颇具代表性。该类产品的最初平均菌数为 lg2.53/cm^2，其菌相由链球菌、小球菌、凝结酶阴性葡萄球菌、摩氏杆菌-不动细菌型和假单孢菌组成。在包装材质为 PVC 薄膜、2℃下贮存 4d 后，菌相

中 86%为假单胞菌、然而，在材质为高氧阻隔型（high-O_2-barrier）薄膜时，在 2℃下贮存 5～15d 后，菌相中 80%～90%的菌为乳酸杆菌，尤其以纤维二糖乳酸杆菌为多。经 15d 贮存后其 lgAPC 值为 6.26/cm²。在对 1～3℃下贮存了 21d 的真空包装羊肉制品进行的另一项研究中发现：其最初菌相构成中，棒状杆菌Ⅰ和Ⅱ型及热死环丝菌为主导菌，然而经 21d 贮存，乳酸杆菌和摩氏杆菌-不动细菌型变为主导菌[38]。对真空包装牛肉，菌相中热死环丝菌大约占 5%[88]。

在 Patterson 和 Gibbs[69]的研究中，pH 为 6.6，屠宰 1d 后的新鲜牛肉进行真空包装。产品最初表面菌数为 lg2.48/cm²，0.2℃下贮存 8 周后其菌数增加至 lg7.69/cm²。其最初菌相构成中，85%为气单胞菌，15%为革兰氏阳性、过氧化氢酶阳性的细菌。经过 8 周贮存，菌相中热死环丝菌占 39%，同型发酵乳酸菌占 22%，适冷的肠道菌占 39%。后一类菌中的大多数（93%）类似于解凝赛氏杆菌。虽然，真空包装可以延长整个或切割家禽的保质期[57]，但对家禽而言，这种作用的有效性受温度的影响较大，以温度为 0℃或低于 0℃时效果最好[56]。对在 1℃下采用真空包装（VP）和气调包装（MAP）的鹿肉进行比较后发现，MAP 与 VP 相比，并未显著提高其保存质量[79]。

按研究生肉的方式，对真空包装熟肉的微生物学特性也进行了研究，113 个切片波罗纳香肠样品中，63%的样品其热死环丝菌数$<10^2$/g，93%样品其热死环丝菌数$<10^4$/g，并且一般不存在产气荚膜梭状芽孢杆菌、金黄色葡萄球菌和沙门氏菌等致病菌[68]。153 个从真空包装切片熟肉制品中分离得到的菌落只有 3 个被鉴定为热死环丝菌，其它大多数为未鉴定的乳酸球菌和杆菌[59]。真空或充氮包装的肉糕（meat loaves），在－4～7℃下贮存 49d 后，微生物菌数并没有显著的差异，但按两种方式处理的产品其菌相构成均发生了变化，最初的菌相构成为：假单胞菌（32%～34%）、环丝菌（24%～38%）、微球菌（9%～22%）和乳酸菌（7%～20%），49d 贮存后变为乳酸菌占主导（62%～72%）[54]。但在另一项研究中，研究人员以真空包装为对照，将烤牛肉贮存在 O_2 比例为 100%～0%的混合气体环境中，在 1～3℃下经 35d 保存后，在各种保存方法的产品中，其适冷菌和乳酸菌的数量并没有占显著的优势[14]。出现这种结果的原因可能是产品最初菌数太高（大约为 4×10^4/cm²）。

在真空包装肉中使用亚硝酸盐时，其菌相中乳酸菌占主导的现象更加明显。这是因为，一方面因为乳酸菌对亚硝酸盐的作用不敏感；另一方面，乳酸菌比一些革兰氏阴性菌更适宜于在微氧环境下生长[64]。而在这些条件下，亚硝酸盐对热死环丝菌和肠道细菌的抑制作用更大。虽然在真空包装环境中，产乳酸的微生物比大多数需氧型菌长得快，但在这种条件下它们的生长滞后期增长，由此可使产品的货架期提高。

真空包装肉品的菌相中乳酸菌与热死环丝菌的相对比例具实际意义。后者对硝酸盐的敏感性要高于前者，因此应该可以预计，在经过亚硝酸盐处理的产品中，其数量是相对缺乏的。在无氧环境下羊肉片的贮藏期可提高 8 周。在 N_2、O_2 和 CO_2 等各种气体按不同比例组合的各种气调环境中，热死环丝菌为生长主导菌[64]。据报道：在真空包装牛肉中，如乳酸菌和热死环丝菌这两种菌的数量基本相等，则前者对后者的生长有明显的抑制作用，但接种这两种菌的牛肉在空气中发生腐败时并无此规律[74]。在后一试验中，CO_2 浓度直至升到 75%，还不能最终抑制热死环丝菌的生长。然而，在真空包装肉品中，如

最初菌相中含有相当数量的热死环丝菌，则该菌的生长速度要高于同型或异型发酵乳酸菌的生长速度，最终成为主导菌[26]。

对真空包装肉品中有关热死环丝菌和乳酸菌哪个占相对优势的问题，有各种报道。在一项研究中，真空包装、菌相中以乳酸菌为主导菌的午餐肉，21d 后总菌数达 10^8/g，仍被认为可食用[26]。这些研究者发现：使产品变质所需的同型发酵乳酸菌数量要高于异型发酵乳酸菌，这是因为异型发酵乳酸菌产生了其他终产物。若使菌数达 10^8/g，同型发酵乳酸菌需 12～20d，而对热死环丝菌和异型发酵乳酸菌大约只需 9d。用充 N_2 和 CO_2 包装的法兰克福香肠在－4～7℃下贮存 49d，热死环丝菌在菌相中的构成从最初的 48%下降至约 5%。充 CO_2 包装时，乳酸菌在菌相中的构成从最初大约 6%升至 94%～96%[83]。生肉在 2℃下贮存 14d，在其菌相构成中大约 30%为乳酸菌，约 18%是热死环丝菌，剩下的即为假单胞菌型菌[29]。其最初的菌数大约为 10^8/g，包装中的 CO_2 浓度大约是 12.3%。

对真空包装牛肉中乳酸菌种类分布情况进行研究后发现：177 株适冷型乳酸菌中，18 株是肠膜状明串珠菌，剩余的是乳酸杆菌及属于异型链杆菌（*streptobacteria*）亚属或异型 B 亚属（*betabacteria*）中的一些菌[42]，与对照组相比，在 4℃下贮存 3 周的真空包装牛排产品中，假单胞菌的数量较少，更多的是乳酸菌（*Lactobacilli*）[60]。虽然一些不同的报道结果可能源于产品的不同，但要正确地将乳酸杆菌进行属和种的分类确实也不容易。不同的研究者对真空包装肉中乳酸菌菌相情况报道有差异的现象仍将继续，直至公认的分类方法出现。

关于安全性，在一项研究中将 A 和 B 型肉毒梭状芽孢杆菌接入生牛肉中，在 25℃下进行长达 15d 的贮存试验。6d 后首次检测出毒素的存在，产品同时伴有明显的感观变化，根据此感观变化现象，在消费前可以将含毒素的真空包装样品加以剔除[41]。在一项有关真空包装的，pH 为 5.47 的新鲜牛腿肉肉糜中，单核细胞增生李斯特菌变化情况的研究中，人们发现：在 4℃下，长达 56d 的贮存时间里，1 株菌在 35d 后菌数增加 2.3logs（从 4.25 到 6.53）；另一株在 35d 后，菌数增加 1.8logs；第三株菌经过 56d 后菌数仍无变化[7]。高 pH（6.14）的牛肉，经过 28d 贮存后，3 株单核细胞增生李斯特菌的菌数都有明显的增加，但 Scott A 株无增加。

在真空包装的熟波罗纳香肠中，由于其正常菌落的生长抑制了小肠结肠炎耶尔森氏菌和沙门氏菌的生长，但对金黄色葡萄球菌不具此抑制作用[65]。正常菌落的生长完全抑制了产气荚膜梭状芽孢杆菌的生长，乳酸菌系的生长抑制了所有病原菌的生长，且当贮存温度下降时，具更大的抑制效果。

综上所述，所有各种类型的真空包装肉都可被认为是安全的，除了可能存在小肠结肠炎耶尔森氏菌和金黄色葡萄球菌外，通常不含食物传播的病原菌。普通存在的乳酸菌落抑制了大多数非乳酸菌的生长，这种抑制作用的机理不能仅用降低 pH 来解释。

5.1.2 气调包装和真空包装肉的腐败

从众多的研究结果来看，很明显，长期冷藏的真空包装肉发生腐败时，其主导菌通常为乳酸杆菌或热死环丝菌，或二者兼有。当然，其他微生物也存在，并且也可能成为

主导菌，其决定因素如下：

①产品是生的还是熟的；

②亚硝酸盐的浓度；

③适冷细菌数量的多少；

④真空包装薄膜阻止 O_2 进入的程度；

⑤产品的 pH。

熟的或半熟的肉制品，以及 DFD 和切面暗红（dark-cutting）肉的 pH 要高于生的和切面亮红（light-cutting）肉的 pH，在真空贮存条件下，这类产品中的主导菌通常与真空包装的正常肉有所不同。真空包装的 DFD 肉在 2℃下贮存 6 周，其主导菌由小肠结肠炎耶尔森氏菌、解凝赛氏杆菌、*Shewanella putrefaciens* 和乳酸杆菌等组成[42]。*S. putrefaciens* 导致产品发绿，但在 pH＜6.0 时可抑制它的生长。pH 为 6.6 的 dark-cutting 牛肉进行真空包装，并贮存于 0～2℃，6 周后，其菌相构成中乳酸菌为主导菌；但经过 8 周后适冷性的肠细菌变为主导菌[65]，大多数的肠细菌类似于解凝赛氏杆菌，剩余的类似于蜂房哈夫尼菌。pH 为 6.0 的真空包装牛肉在 0～2℃，经 6 周贮存后，类似于小肠结肠炎耶尔森氏菌的菌数量达 10^7/g，但对 pH＜6.0 的肉，即使经过 10 周贮存，它们的数量也不会超过 10^5/g[76]。高 pH 的肉制品经 10 周贮存后 *S. putrefacieus* 菌的数量也达 lg6.58/g。

最终 pH 约为 5.6 的正常牛肉进行真空包装时，乳酸杆菌和其它乳酸菌为主导菌。牛肉在有氧条件下发生的腐败，在 APC 达到 10^7～10^8/cm² 时，就会有酸味产生，并且其菌相中大约 15%的菌为假单胞菌。但在真空包装条件下发生腐败时，产品的 pH 会有轻微的增加，其 ERV 值通常也会增大[38]。Hitchener 等人发现[43]：真空包装的生牛肉在 0～1℃下，经过 9 星期的贮存，其菌相中 75%是由过氧化氢酶阴性菌构成的。对分离得到的 177 株菌进行进一步特性鉴定，18 株为肠膜状明串珠菌，115 株为异型发酵乳杆菌，44 株为同型发酵乳杆菌。使用高阻氧的薄膜时，真空包装的牛排产品经 12 和 24d 贮存后，其主导菌群为异型发酵乳酸杆菌，92%的牛排产品中分离得到了纤维二糖乳酸杆菌[91]。59%的样品其菌相构成中纤维二糖乳酸杆菌占 50%或更多。研究人员同时发现：使用中度阻氧性薄膜材料进行包装时，气单胞菌、肠细菌、哈夫尼菌、热死环丝菌、*Morganella. morganill* 和假单胞菌属在菌相中通常占有较高的比例。

产品中含高浓度亚硝酸盐时，通常会抑制热死环丝菌和适冷型肠细菌的生长，乳酸细菌由于对亚硝酸盐的作用呈相对不敏感态而成为主导菌[64]。然而，低浓度的亚硝酸盐似乎不影响热死环丝菌的生长，尤其在真空包装的熟食制品中。Egan 等人[24]将热死环丝菌、一株同型发酵和另一株异型发酵乳酸杆菌接种于含 240mg/kg 硝酸盐和 20mg/kg 亚硝酸盐的盐腌牛肉和切片火腿中，热死环丝菌在该产品中的生长不存在生长滞后期（lag phase）。在 5℃下，其生长代时为 12～16h，而异型发酵乳杆菌的生长代时为 13～16h，同型发酵乳杆菌的生长代时为 18～22h。这三株菌的菌量达到 10^8 个/g 的时间分别为 9d、9～12d和 12～20d。虽然当热死环丝菌的菌量达 10^6/g 的 2～3d 后，产品便有变质的风味产生，但对同型和异型发酵乳酸杆菌则分别在菌量达到 10^8 个/g 后的 11d 和 21d 后才出现此现象。在真空包装午餐肉的腐败方面，热死环丝菌的作用要比乳酸菌更有效[25]。另

一方面，热死环丝菌的生长滞后期要比乳酸菌的长，而其生长速率要低于乳酸菌[31]。当两种菌菌数基本相等时，乳酸菌的生长通常占主导地位。

大量的研究表明：红色肉在限制氧气进入包装的条件下，0～5℃经几周贮存后，其最终菌相中乳酸菌为主导菌。例如，在一项对真空包装牛肉和羊肉贮存过程中菌相变化的研究中发现：贮存 28～35d 后，乳酸杆菌取代最初的棒状杆菌和热死环丝菌而成为主导菌[37,38]。随着真空和气调包装（MAP）的广泛使用，以及更为精确的分类方法的应用，似乎可以认为：产品在这些贮存条件下，至少两种菌群可被认为是确实存在的。

至少两种明串珠菌（*L. carnosum* 和 *L. geldium*）尤其适合在真空包装的和 MAP 肉中生长。在一份高 O_2 和 CO_2 下包装的猪排样品中，检测出未命名的明串珠菌，其数量占菌相的 88%～100%[75]。在另一项类似的研究中，它们也成为菌相构成中的主导菌群[35]。对从真空包装肉中分离得到的乳酸细菌进行深入的研究后，最终鉴定为 *L. carnosum* 和 *L. geldium*[80]。这两种菌均可在 1℃下生长，但 37℃下不能生长，两者均可分解葡萄糖产生气体。

第二群菌是一些现已归类于肉食杆菌属的一些菌。这些过氧化氢酶阴性菌是异型发酵的，但只产生 L（+）-乳酸，并分解葡萄糖产生气体（典型的异型发酵细菌产生 D-和 L-乳酸）。1987 年以前，肉食杆菌归类于乳酸菌属。从真空包装牛肉中分离得到的 159 株乳酸菌中，115 株不能被鉴定至种的水平[43]。从真空包装的牛肉、猪肉、羊肉和腌肉中也分离得到了相似的菌株[80]。另一组研究者从真空包装的牛肉中也分离得到类似的菌株，通过进一步的研究，将这些特异的菌命名为歧异乳杆菌（*Lactobaeillus divergens*）[45]。研究中同时发现：120 株分离得到的适冷菌中，该菌占了 6.7%，在 pH 为 3.9 或者 4℃的 MRS 培养基中，它们均不能生长。通过进一步的 DNA-DNA 杂交和其它研究，建立了肉食杆菌这一新属。*L. divergens* 和另外两种乳酸菌被归入于这一新属中[15]。新命名的歧异肉食杆菌（*C. divergens*）与真空包装肉类产品有关，而鱼肉食杆菌（*C. piscicola*）和游动肉食杆菌（*C. mobile*）分别与鱼品和辐射保藏鸡制品有关。因为歧异肉食杆菌不产生 H_2S 和其它恶臭味成分，它或许不是一种腐败细菌。事实上，它与上面所提及的两种明串珠菌一样，在不可透气薄膜包装的产品中有潜在的应用价值，它们能产生足够的 CO_2 来抑制微生物的生长。

有关热死环丝菌在真空包装肉中的性质、特性在第二部分 3 中进行了讨论。在有氧条件下，它可以在 pH 为 5.4 的牛肉中生长，但在厌氧条件下，pH＜5.8 时不生长[10]。在厌氧条件下，最小生长 pH 是 6.0。*S. putrefaciens* 对 pH 也敏感，在正常 pH 的牛肉中不生长，但在 DFD 肉中可以生长。

5.1.3 真空包装肉和家禽中的挥发性成分

真空包装肉在腐败菌作用下产生的变质气味和风味的成分列于表 5.3 中。总的来说，乳酸菌和热死环丝菌均可产生短链脂肪酸，并且在腐败的产品中含有那些赋予制品以强烈变质味的化合物。真空包装的午餐肉中，与腐败风味相关的成分主要是羟基丁酮和丁二酮[85]。在含有葡萄糖和其他简单碳水化合物的培养基（APT）中，低葡萄糖含量和中性附近的 pH 有利于热死环丝菌形成异丙酸和异戊酸，而在高葡萄糖含量和低 pH 下，有

利于其形成羟基丁酮、乙酸、2,3-丁二醇、3-甲基丁醇和3-甲基丙醇[16,17]。根据这些作者的研究，保存在有氧环境中的生和熟肉制品中，羟基丁酮是主要的挥发性化合物。这说明：热死环丝菌产生的挥发性化合物，会随着产品中葡萄糖含量高低的变化而变化。在生牛肉糜中加入2%的葡萄糖，会使产品的pH下降，并延缓变质味和黏液的产生，但它不影响通常存在的腐败菌菌相的构成[82]。虽然，该研究没有涉及真空包装肉，但这些产品产生的挥发性成分也无非是一些短链脂肪酸、羟基丁酮及其它来源于葡萄糖代谢的产物。因为真空包装的、高pH肉的货架期很短，因此，从这方面来说，加入葡萄糖也许是有利的。

表5.3　腐败菌群和腐败菌在肉、禽、水产或培养基中产生的挥发性化合物

微生物/接种体	底物/条件	主要挥发性成分	参考文献
Shewanella	灭菌过的鱼肌肉	二甲基硫化物，二甲基三硫化物	
Putrefaciens	1～2℃，15d	甲基硫醇，二甲胺，丙醛，1-五亚乙基六胺3-醇，H_2S等	57
无色杆菌	同上	除了无二甲基三硫化物或H_2S，其余同上	57
荧光假单胞菌	同上	甲基硫化物，二甲基二硫化物	57
P. perolens	同上	二甲基三硫化物，二甲基二硫化物，甲基硫醇、2-甲氧基3-异丙基吡嗪（似土豆味）	58
摩氏杆菌	TSY琼脂，2～4℃，14d	16种化合物，包括二甲基二硫化物，二甲基三硫化物，异丁酸甲酯和甲基-2-丁酸甲酯	53
荧光假单胞菌	同上	15种化合物，除异丁酸甲酯外，其余同摩氏杆菌产生的化合物	53
恶臭假单胞菌	同上	除甲基-2丁酸甲酯外，其余同荧光假单胞菌产生的化合物。14种化合物	53
热死环丝菌	接种于真空包装的盐腌牛肉中，5℃	7种化合物，包括丁二酮壬烷，3-甲基-丁醇和2-甲基丁醇	85
	有氧贮藏，接种于牛肉片中，1℃，14d pH5.5～5.8	羟基丁酮、乙酸异丁/异戊酸、28d后乙酸量增加4倍	16
	同上，pH6.2～6.6	乙酸，异丁酸，异戊酸和n-丁酸	16
	APT培养液，pH6.5、0.2%葡萄糖	羟基丁酮，乙酸，异丁酸和异戊酸	16
	APT培养液，pH6.5、无葡萄糖	除无羟基丁酮外，其余同上	16
热死环丝菌（15株）	APT培养液，pH6.5，0.2%葡萄糖	羟基丁酮，乙酸，异丁酸和异戊酸，微量的3-甲基丁醇	17
S. putrefaciens	在辐射保藏的鸡肉产品中生长，5d，10℃	H_2S，甲基硫醇，二甲基二硫化物，甲醇，乙醇	27
莓实假单胞菌	同上	甲醇，乙醇，乙酸甲酯和乙酸乙酯，二甲基硫化物	27
热死环丝菌	同上	甲醇、乙醇，	27
菌群	腐败鸡肉	包括H_2S的氧化合物，甲醇，乙醇，甲基硫醇，二甲基硫化物，二甲基二硫化物	27

在一项有关真空包装肉腐败情况的研究中发现，当菌数达到10^7～$10^8/cm^2$时，有明显的硫化物气味[36]。分离得到的主导菌为蜂房哈夫尼菌、乳酸杆菌和假单胞菌。硫化物

气味可能产生于蜂房哈夫尼菌。真空包装的冷藏生牛肉在加工后一周内发生的腐败，其主要特征是产生大量的氢气味的气体，并伴随发生大范围的蛋白质水解作用[48]。其原因菌是 *clostridium Laramie*，这是一种适冷型的新菌种[47]。另一种发现于真空包装冷藏猪肉中的嗜冷型梭状芽孢杆菌是 *C. algidicarnis*。从腐败的冷藏真空包装肉中分离得到了另一株可大量产生 H_2、CO_2、丁醇和丁酸，以及酯和挥发性含硫化合物的细菌[18]。它是一种适冷型的菌，在1～15℃生长，22℃即不生长，已被命名为 *clostridium estertheticum*[14]。

从表 5.3 所列的挥发性成分来看，很明显，除了热死环丝菌，所有腐败菌均产生二甲基二硫或三硫化物或甲基硫醇。Freeman 等人[27]对 11 种接种于鸡肉中的菌进行检测后发现：其中 8 种产生二甲基二硫化物，7 种产生乙醇，6 种产生甲醇和乙酸乙酯。生长在真空包装肉上的 *S. putrefaciens* 持续产生 H_2。接种有假单胞菌Ⅱ组菌株的鸡胸肉在 2℃下贮存 14d 后，经过色谱峰检出的气味成分被 McMeekin[55]描述为似“硫化物的”、“浓缩乳的”和“水果的”气味。

5.2 香肠、腊肉、波罗纳香肠和相关的肉制品

除了肉中的各种成分，香肠和法兰克福香肠在生产中通常要添加一些调味料和配方中的其他成分，这些成分的加入是产品中微生物的另一个来源。许多香料和调味料中含有较多的微生物。乳粉通常又是一些多成分产品中乳酸菌和酵母的来源。在猪肉香肠中，中性的肠衣已被确认含有高数量的细菌。Riha 和 Solberg[78]在研究盐-包装（salt-packaged）肠衣中发现：其菌数在 lg4.48～lg7.77 之间，而对湿-包装（wet-packaged）肠衣，其含菌量为 5.26～7.36。从这些中性肠衣中分离的菌 60%以上是芽孢杆菌，其次是梭状芽孢杆菌和假单胞菌。在新鲜猪肉香肠的各种成分中，由肠衣带入产品的细菌最多[87]。

诸如波罗纳香肠和萨拉米香肠等肉制品中，微生物的数量和类型也许能反映其成分构成的大致情况。法兰克福香肠的菌相构成中，绝大多数是由微球菌、芽孢杆菌、乳酸杆菌、微杆菌、链球菌和明串珠菌等革兰氏阳性菌及酵母组成[22]。在对法兰克福香肠发黏现象的研究中，人们发现：353 株分离菌中 275 株为细菌，78 株为酵母。热死环丝菌是最典型的单一分离菌。关于肉毒梭状芽孢杆菌芽孢在肝泥香肠（liver sausage）中的检出率，经过热处理（75℃，20min）的产品中的 276 种中有 3 种含 A 型肉毒毒素，而未经热处理的产品中的 276 种中有 2 种含 A 型肉毒毒素[40]。在这类产品中肉毒杆菌芽孢的最大可能值（MPN）为 0.15/kg。

据报道，Wiltshire 腊肉的总菌数通常在（lg5～lg6）/g 之间[46]，然而，高盐、真空包装的腊肉，其含菌量通常较低——大约为 lg4/g。在真空包装切片腊肉的菌相构成中，除了乳酸型的过氧化氢酶阴性菌，如乳酸菌、明串珠菌、片球菌和 D 组链球菌外，大多数是由过氧化氢酶阳性球菌，如微球菌和凝结酶阴性葡萄球菌构成[3,11,60]。熟萨拉米香肠中的菌相被认为主要是由乳酸菌构成的。

所谓的“精华”食品（soul food）由于其含有与肠道菌直接接触的内脏，以及在屠宰及加工中未能得到更好处理的其他部件，如猪蹄和猪耳，而使其可能含有较多的微生物。这种推测已被 Stewart[86]在一项研究中所证实，他发现小肠（猪肠）APC 几何平均值为

lg7.92/g，动物胃的含菌量为lg7.51/g，肝布丁中为lg7.32/g。在小肠、动物胃和肝布丁中金黄色葡萄球菌的APC几何平均值分别为lg5.81/g、lg5.70/g和lg5.15/g。

5.2.1 腐败

不同于本部分内容中所提及的其它肉制品，法兰克福香肠、波罗纳香肠和午餐肉由各种成分制成，任何一种或所有成分都可能给最终产品带来微生物污染。细菌、酵母和霉菌在肉制品中都可能检出，但是前二类微生物在这些产品的腐败中占有更重要的地位。

这些产品的腐败通常有三种类型：发黏、酸败和发绿。发黏腐败常发生在肠衣的外层，在法兰克福香肠中尤为如此，在其发生早期以单个菌落形式出现，随后多菌落接合为一体，形成一层灰色的发黏层。从发黏物质中可分离到酵母、乳酸杆菌、肠球菌、魏斯氏菌和热死环丝菌。*W. viridescens* 既产生发黏现象，又可使产品发绿。潮湿的表面有利于发黏现象的产生，发黏通常只限于肠衣外层。用热水除去这些发黏物质后产品的特性基本不变。

酸败通常发生于这些肉制品的肠衣内，是由乳酸杆菌、肠球菌及相关微生物引起的。肉制品中这些微生物通常源于乳粉。微生物对乳糖和其它糖的利用及产酸是酸败的直接原因。由于各种调味料的使用，香肠通常比其它大多数肉制品含有更多类型的微生物，几乎所有的调味料均将它们自己特有的菌群带入产品中。热死环丝菌被许多研究者认定为引起香肠腐败的最主要的菌种。

虽然霉菌腐败并不常见于这类产品中，但在适宜的条件下它也可能、也确实会引起产品的腐败。当产品的水分含量较高、并贮存在高湿条件下时，它们易发生由细菌和酵母引起的腐败。只有当产品贮存在不适宜细菌或酵母生长的条件下或产品表面比较干燥时，霉菌腐败才可能发生。

红色肉制品在贮存中通常发生两种类型的发绿变质：一种是由 H_2O_2 引起，另一种是由 H_2S 引起。前一种类型的发绿变质常发生在法兰克福香肠以及其它腌制和真空包装肉制品中。在厌氧条件下保存的肉制品一旦暴露于空气中，通常会出现前一类型的发绿变质。在空气中，产生的 H_2O_2 与亚硝基血色原反应可生成绿色的氧化卟啉化合物[34]。在产品中心，由于其低O/R势有利于原因菌的生长，从而导致 H_2O_2 的积累，使产品中心也发生发绿现象。虽然明串珠菌、粪肠球菌和粪渣肠球菌也会引起产品的发绿，但绿色魏斯氏菌是引起此类发绿现象的最常见的菌。产生 H_2O_2 的菌，例如蚀果乳酸杆菌和詹生氏乳酸杆菌（*L. jenesenii*）也会使产品变绿。绿色魏斯氏菌在 $NaNO_2$ 浓度小于200mg/kg或食盐浓度在2%～4%时可以生长，但当食盐浓度达7%时便无法生长[34]。在厌氧腐败的法兰克福香肠、烟熏猪排和贮存于 CO_2 和 N_2 混合气体中的法兰克福香肠中已发现有 *W. viridescens* 的存在[4]。尽管有变色现象产生，但食用发绿的肉制品未发现有危害作用。

第二种类型的发绿通常发生在那些在1～5℃下贮藏于不透气或真空包装容器中的新鲜红色肉上，它是由于 H_2S 的产生而引起的。H_2S 同肌红蛋白反应生成硫化氢肌红蛋白（sulphmyoglohin）（表5.4）。当肉的pH<6.0时，通常不会发生这种类型的发绿现象。在一项研究中，恶臭假单胞菌被认为是与之相关的菌[63]。但在对DFD肉的另一项研究中，*S. putrefaciens* 菌被认为是 H_2S 的产生菌[32]。在后一项研究中同时也发现：发绿现象

与葡萄糖存在的情况有关，通过降低 pH 至 6.0 以下的方法可以抑制变绿。产生 H_2S 的乳酸杆菌可以存在于真空包装的新鲜牛肉中，在 pH 为 5.4～6.5 之间，它可产生 H_2S[81]。但只产生轻微的发绿现象，其 H_2S 是通过质粒体上的一系统由半胱氨酸产生的。在 50℃下，7d 后菌数达 $3\times10^7/cm^2$，最终菌数达 $10^8/cm^2$。然而在真空包装的切片午餐肉中，当另一种乳酸杆菌菌数达 $10^8/cm^2$ 时，还未发现有变质现象。

表 5.4　　新鲜的、腌制或熟肉制品中的色素

色　素	形 成 方 式	铁的状态	血红素环的状态	珠蛋白的状态	色泽
肌红蛋白	高铁肌红蛋白还原；氧合肌红蛋白脱氧	Fe^{2+}	完整	天然	紫红
氧合肌红蛋白	肌红蛋白的氧合	Fe^{2+}	完整	天然	亮红
高铁肌红蛋白	肌红蛋白、氧合肌红蛋白氧化	Fe^{3+}	完整	天然	棕红
NO 肌红蛋白	NO 与肌红蛋白结合	Fe^{2+}	完整	天然	亮红
亚硝基肌红蛋白	正铁肌红蛋白与过剩亚硝酸盐结合	Fe^{3+}	完整	天然	红色
肌红蛋白血色原	热，变性剂对肌红蛋白、氧合肌红蛋白作用；肌红蛋白高铁血色原受辐射	Fe^{2+}	完整	变性	暗红
肌红蛋白高铁血色原	热、变性剂对肌红蛋白、氧合肌红蛋白、正铁肌红蛋白、血色原的作用	Fe^{3+}	完整	变性	棕色
亚硝酰基肌血色原	热、盐对亚硝基肌红蛋白作用	Fe^{2+}	完整	变性	亮红
硫代肌绿蛋白	H_2S 和 O_2 对肌红蛋白的作用	Fe^{3+}	完整但被还原	变性	绿
胆绿蛋白	H_2O_2 对肌红蛋白或氧合肌红蛋白的作用；抗坏血酸或其它还原剂对氧合肌红蛋白的作用	Fe^{3+}	完整但被还原	变性	绿
高铁胆绿素	肌红蛋白或氧合肌红蛋白与过量的 H_2S、O_2 的作用	Fe^{2+}	卟啉环打开	变性	绿
胆色素	肌红蛋白或氧合肌红蛋白与大大过量的 H_2S、O_2 的作用	无 Fe	卟啉环破坏；链状卟啉	缺	黄或无色

在真空包装牛肉中至少有一株清酒乳酸菌（*Lactobacillus sake*）被证实能产生 H_2S。pH 和葡萄糖对 H_2S 产生的影响列于表 5.5[23]。研究者发现：该清酒乳酸菌引起的发绿现象并不像 *S. putrefaciens* 菌那么强烈，在 0℃下经大约 6 周后才出现发绿现象。更进一步说，乳酸杆菌只在缺氧和可利用糖源的情况下才会产生 H_2S。当使用透氧率为 $1mL/m^2$ 或 $300mL/m^2$ 的包装薄膜时，无发绿现象产生，但在使用透氧率在 25～200mL/（m^2 · 24h）的包装薄膜时，确实存在发绿变质现象[23]。只有在使用透氧率为 100 和 200mL/（m^2 · 24h）的包装薄膜和经过 75d 的贮存的样品中才可观察到可见的发绿现象。pH 为 6.4～6.6 的肉，当菌数达到 $10^8/g$ 时，H_2S 可被检出。

真空包装午餐肉型肉品的泛黄（yellow discoloration）现象明显是由 *E. casseliflavus* 引起的。在 4.4℃下贮存的产品其黄变以小点形式出现，变色点在长波紫外光下可发荧光[93]。这种现象的形成约需 3～4 周的时间，其相关的菌在 71.1℃，20min 热处理下可残存，但时间延至 30min 即死亡。除了 4.4℃，黄变在 10℃时也可发生，但 20℃或者 20℃以上则不发生该现象。虽然引起黄变的菌临时被鉴定为 *E. casseliflavus*，但它不与 D 组抗

毒血清（Grpoup D antisera）发生反应。其它产生黄色色素的肠球菌是 *E. mundtii*；这两种菌将在第六部分 18 中作进一步讨论。

表 5.5　肉的 pH 和葡萄糖对 *L. sake* L13 纯菌产生 H_2S 作用的影响

（厌氧培养，培养温度 5℃，牛肉）

培养天数	pH5.6～5.7	pH6.4～6.6	pH5.6～5.7、250μg 葡萄糖/g 肉
8	−[a]	−	−
9	−	+[c]	−
11	−	+	−
15	−	+	−
18	+[b]	+	+[c]
21	+	+	−

注："−"：3 管均为阴性；"+"：三管均为阳性。

[a] 每次处理作三次平行实验；[b] 3 管中 2 管为阳性；[c] 三管中一管为阳性。

5.3　腊肉和腌制火腿

这些产品的特性以及在其制作过程中采用的诸如烟熏、盐浸等工艺使得它们不易发生由大多数细菌引起的腐败。腊肉腐败最常见的形式是霉变，这种霉变可能是由曲霉、交链孢霉、镰刀霉、毛霉、根霉、葡萄孢霉、青霉和其他霉菌引起的（表 5.2）。该类产品的高脂含量及低 A_w 的特性决定了它们易于发生此类变质。在诸如 Wiltshire 等一些特殊的腊肉中，细菌中的肠球菌、乳酸杆菌和微球菌也可能良好地生长，在某些腊肉品种中粪肠球菌也常被检出。真空包装的腊肉易发生主要由微球菌和乳酸杆菌引起的变酸。真空包装的、低盐含量的腊肉在 20℃以上贮存时，可发生由葡萄球菌引起的腐败变质[89]。

腌制火腿发生腐败的类型与新鲜或烟熏火腿发生的腐败有所不同。其主要原因是：注入火腿的腌制液中含有糖，而这些糖的存在可被火腿中原有的自然菌群和那些随腌制液注入产品的菌群，例如乳酸杆菌所利用。根据它们在火腿中的分布，糖被发酵、利用后产生了各种类型的"变酸"。导致火腿"变酸"的菌涉及许多属中的细菌，有不动细菌属菌、芽孢菌、假单胞菌、乳酸杆菌、变形杆菌、微球菌和梭状芽孢杆菌。在腌制火腿中检出的梭状芽孢杆菌属中的细菌均无产气能力。

在研究真空包装切片腊肉过程中，Cavett[11]和 Tonge 等人[89]发现：高盐含量的腊肉在 20℃下贮存，经过 22d 后其菌相中以过氧化氢酶阳性的球菌为主导菌；而在 30℃下，凝结酶阴性的葡萄球菌变为主导菌。低盐腊肉（5%～7%食盐，相对于 8%～12%的高盐腊肉）在 20℃下贮存时，微球菌以及粪肠球菌为主导菌；在 30℃下，凝结酶阴性的葡萄球菌及粪肠球菌和微球菌为主导菌。这类产品腐败的特征是产生"干酪味"，酸-芳香味和腐败臭味。

对有氧条件下，5℃贮存 35d 或 10℃贮存 21d 的低脂 Wiltshire 腊肉进行研究后，Gardner[28]发现：当菌数达到 10^9/g 时，硝酸盐被还原为亚硝酸盐。在这个阶段中，其主导菌是微球菌、弧菌和假丝酵母及球拟酵母。在长时间的贮存过程中，随着亚硝酸盐的消失，微生物数量达到 10^{10}/g。在这一阶段中，不动细菌属、产碱杆菌属和节细菌—棒状杆菌属菌变得更为重要。微球菌总是可以检出，然而在所有盐含量高于 4%的腊肉中总能检出弧菌。

更多的有关这些产品的腐败问题的论述可参阅 Gardner[30]所写的综述文献。

5.4 发酵肉制品

发酵香肠通常是作为干或半干制品生产的，尽管它的某些产品的水分含量处在干和半干之间。干的或意大利型香肠含 30%～40%的水分，这类产品通常不经烟熏或热处理，无须蒸煮可直接食用[70]。在它们的制作过程中，先将腌制盐和调味剂加入肉糜中，然后将其灌入肠衣中，在 26.7～35℃下培养不同的时间。当使用发酵剂时，培养的时间可以缩短。腌制盐中含作为发酵底物的葡萄糖和作为色泽稳定剂的硝酸盐或亚硝酸盐。在只使用硝酸盐的情况下，香肠中必须含有可将硝酸盐还原成亚硝酸盐的细菌，微球菌通常存在于香肠的菌相中或者可人为地将该菌接至肉糜中。培养过程中发生发酵作用。培养后将产品置于相对湿度为 55%～65%的干燥室内进行为期 10～100d 的成熟，在匈牙利式萨拉米香肠生产中，放置成熟的时间达 6 个月[66]。热那亚式和米兰式萨拉米香肠是干香肠的另外几种例子。

对干香肠的一项研究发现：成熟期的最初 15d 中，产品的 pH 从 5.8 降至 4.8，然后基本保持恒定[21]；9 种不同品牌的工业化生产的干香肠，它们的 pH 在 4.5～5.2，平均为 4.87。对在生产中不加发酵剂的发酵干香肠的菌相变化情况进行研究后，Urbaniak 和 Pezacki[90]发现：在整个发酵过程中，同型发酵菌为主导菌，而其中又以植物乳杆菌为最常见的菌种。短乳杆菌和布启里氏乳杆菌（*L. buchneri*）等异型发酵菌在 6d 培养期内菌数有所增加，其原因是由于同型发酵菌的生长导致产品的 pH 和 Eh 发生了改变。

肉干（Jerky）是一种以经过轻度盐渍和调味的肉或鱼片为原料，通过干燥工艺制成的、具有良好货架稳定性的食品。主要以牛肉干为主。将产品 A_w 降至 0.86 以下的干燥过程如果能在 3h 之内完成，则不太可能发生由病原菌引起的质量问题。但如果干燥速度过慢，在低于 60℃下维持的时间过长，金黄色葡萄球菌则有可能残存[44]。近期，93 人因食用含有 3 种沙门氏菌的牛肉干而生病，这 3 种沙门氏菌是：蒙得维提俄沙门氏菌（*S. montevideo*），肯塔基沙门氏菌（*S. kentucky*）和鼠伤寒沙门氏菌[12]。该产品由一个加工厂出品，但它如何被污染的，现在并不清楚。

除了干燥程度的不同，半干香肠的制作方式基本同干香肠。它们含大约 50%的水分，烟熏过程中可使产品的中心温度达到 60～68℃，以此完成制作过程。图林根香肠、德式干香肠、春香肠和黎巴嫩红肠是半干香肠的一些品种。“春香肠”是指那些北欧地区的传统型香肠，在冬季生产、贮存、成熟，在春季食用。它们可能是干制品也可能是半干制品。

黎巴嫩红肠是半干香肠的一种典型品种。这种产品发源于黎巴嫩、美国宾夕法尼亚州，是一种由全牛肉构成，经深熏（heavily smoked）和调味工艺生产的产品，它也可以通过接入啤酒片球菌作为发酵剂来制作。这些产品的制作过程是：先将大约3%的食盐连同糖、调味料、硝酸盐或亚硝酸盐（或两者都加入）加至块状生牛肉中。盐渍过的牛肉在冷藏温度下经过大约10d的成熟，在此期间，自然存在的乳酸细菌或加入的发酵剂得以生长，而革兰氏阴性菌的生长被抑制。烟熏过程中温度较高，使微生物具有较高的生理活性，同时具有部分干燥作用。该产品的工厂化生产工艺已开发成功[67]，此工艺主要包括在5℃下对盐渍过的牛肉进行为期10d的成熟及在35℃，相对湿度（R.H）较高的条件进行为期4d的烟熏处理。发酵作用既可以由肉中自然存在的菌群产生，也可通过使用工业化生产的啤酒片球菌或乳酸片球菌作为发酵剂来实现。在黎巴嫩红肠中产生的酸的数量可达0.8%～1.2%[70]。

由于一次旋毛虫病（*trichinosis*）的暴发，使人们对食用不按规范工艺、家庭自制的发酵香肠的危害性的认识有了进一步提高。该次事件中，食用了生的春香肠的50人中，23人患上了旋毛虫病[72]。该批香肠按家传的方法，分三批在不同的2d时间内制作而成。因为生产者认为低温可以生产风味更好的产品，所以该法采用的烟熏温度较低。所有3批香肠生产的原料均为家养（horse-raised）牛肉。另外，受害者食用的两批产品中，一批采用的生产原料为经美国农业部（USDA，U.S. Department of Agriculture）检疫的猪肉，另一批为家养猪肉，但*Trichinella spiralis*（一种旋毛虫）恰恰只存在于经USDA检疫过的猪肉中。旋毛虫可以通过热处理加以杀灭，但处理的中心温度至少要达60℃（见第六部分27）。

不使用发酵剂方法生产的发酵香肠中含有大量诸如植物乳杆菌等乳酸杆菌[20]。啤酒片球菌的使用可使产品质量更为理想[19,39]。Smith和Palumbe[84]对工业化生产的发酵香肠进行研究后发现：产品的总菌数（APC）为10^7～10^8/g，而又以乳酸菌为主。当使用发酵剂时，产品最终pH在4.0～4.5之间；而不用发酵剂的产品，最终pH在4.6～5.0。对春香肠，经过72h的发酵，pH可达4.5～4.7[2]。他们同时发现：在30℃和37℃下发酵产生的pH要比在22℃下发酵产生的pH低，产品最终的pH直接与产生的乳酸数量有关。在长时间的干燥过程中，发酵香肠pH可提高0.1或0.2单位。其机理是：碱性化合物数量的增加导致缓冲作用的不规则（uneven buffering）[92]。加入糖的种类决定了发酵最终pH的大小。虽然葡萄糖是普遍使用的一种糖源，但蔗糖在产生低pH方面与葡萄糖有等同的效果[1]。冷冻干燥制成的发酵剂（啤酒片球菌）对加入香肠中的不同糖源的利用情况见图5.1。

早在20世纪50年代后期，发酵香肠的生产是通过加入一小块已经发酵过的产品作为发酵引子（hack inoculation）或加入一些促进原料中存在的、对产品发酵有利的物质的方法来完成的。同其它许多发酵食品一样，这些产品的制作，其制作技巧性超过科学性。纯发酵剂的使用，不但可以缩短生产时间，而且可生产更为安全、标准更为一致的产品[26]。虽然，事实上发酵剂在乳品工业中已使用多年，但在全世界范围内，它们在许多非乳品制品中的应用还是近年来的事。橙色微球菌（*Micrococcus aurantiacus*）已与其它发酵剂一起用于欧式香肠的生产[65]。在欧洲，微球菌和葡萄球菌，尤其是*S. carnosus*

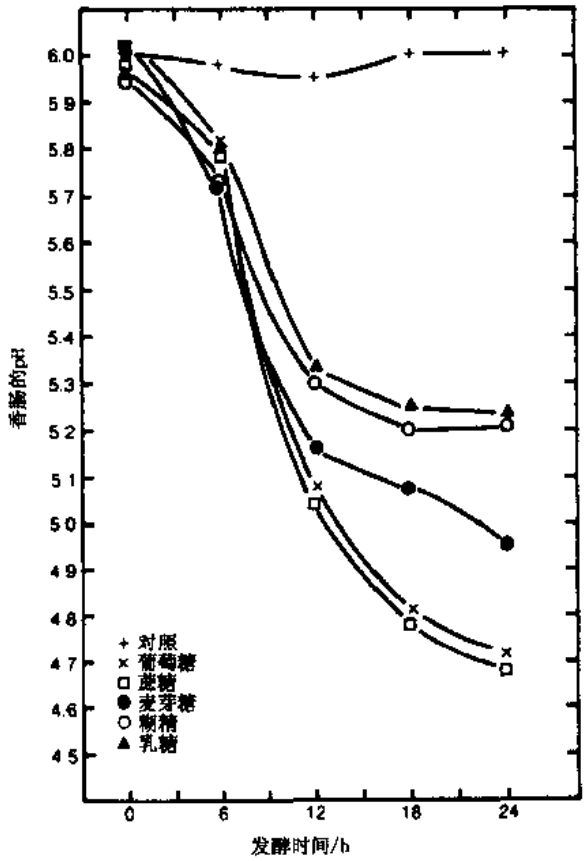


图 5.1　含 0%或 1%的不同糖源的发酵香肠中 pH 的下降速度

加入乳酸菌培养基中，已是普遍的做法了。非产乳酸菌成员可还原硝酸盐至亚硝酸盐，并产生过氧化氢酶，对乳酸菌生长有利。

霉菌被认为与诸如意大利萨拉米香肠等欧式干香肠的质量有关。在对成熟肉制品中真菌的研究中，Ayres 等人[6]发现：在发酵香肠中存在有 9 种青霉和 7 种曲霉；并由此得到出结论，在这类产品的保藏中，这些真菌发挥了作用。产品中很少有其它种类霉菌的存在。近来，对意大利北部自然发酵的香肠其真菌构成的研究，揭示了一个事实：其菌相中，青霉占 96%，曲霉占 4%[4]。这种香肠的最初菌相构成中酵母占 95%以上，两星期后，酵母和霉菌比例达 50∶50，但 4～8 周后，霉菌在菌相中的构成达 95%以上[4]。50%的霉菌是纳地青霉（*P. nalgiovense*）。在生干香肠的腌制过程中，加入沙门柏干酪青霉和纳地青霉，以抑制产真菌毒素的霉菌生长的试验已取得成功，其效果比山梨酸盐要好得多[8]。

乡村腌制火腿是一种产于美国南部的干腌火腿，在其长达 6 个月至 2 年腌制和成熟时间里，其表面生长有一层很厚的霉菌。虽然 Ayres 等人[5]认为：霉菌的存在不是太主要的因素，令人满意的腌制效果也不取决于它们的存在与否，但是这些大量生长的霉菌在产品某些风味的形成方面所起的作用似乎是可以肯定的，就这方面作用而言，酵母的作用要比霉菌低。大量霉菌的生长抑制了食品腐败菌的生长、排除了食物中毒的发生，从

这层意义上讲，霉菌对保藏是有辅助作用的，Ayres 等人[5]发现：在乡村火腿中，曲霉和青霉是主要的霉菌类型。

乡村火腿的制作时间是在早冬季节，制作时先将糖涂抹（rubbing）于皮里和腿端上。过一段时间后，将食盐涂抹于所有无皮覆盖的火腿各部位。然后将火腿用纸包裹、单独放入棉布织物袋中，在 32～40 C 平放若干天。火腿腿端朝下悬挂于火腿房中，为期 6 周或更长的时间。在此期间，也可用山胡桃进行烟熏，但对某一特定产品而言，烟熏并非是必不可少的。

意大利型乡村香肠其腌制盐中只有食盐一种成分。腌制过程大约需 1 个月，接下来的程序是：清洗、干燥和成熟（6～12 月或更长）[33]。虽然在意大利火腿成熟过程中嗜盐和耐盐细菌的量有所增加，但通常来讲，微生物群落（microflora）被认为只起很小的作用[33]。更详细的有关肉发酵剂和发酵香肠的配方以及乡村火腿的腌制盐成分等可见参考文献[6,70]。

参 考 文 献

[1] Acton, J. C., R. L. Dick, and E. L. Norris. 1977. Utilization of various carbohydrates in fermented sausage. *J. Food Sci.* 42: 174～178.

[2] Acton. J. C., J. G. Williams, and M. G. Johnson. 1972. Effect of fermentation temperature on changes in meat properties and flavor of summer sausage. *J. Milk Food Technol.* 35: 264～268.

[3] Allen, J. R., and E. M. Foster. 1960. Spoilage of vacuum-packed sliced processed meats during refrigerated storage. *Food Res.* 25: 1～7.

[4] Andersen, S. J. 1995. Compositional changes in surface mycoflora during ripening of naturally fermented sausages. *J. Food Protect.* 58: 426～429.

[5] Ayres, J. C., D. A. Lillard, and L. Leistner. 1967. Mold ripened meat products. In *proceedings 20th Annual Reciprocal Meat Conference*, 156～168. Chicago: National Live Stock and Meat Board.

[6] Bacus, J. 1984. *Utilization of Microorganisms in Meat Processing: A Handbook for Meat Plant Operators*. New York: Wiley.

[7] Barbosa, W. B., J. N. Sofos, G. R. Schmidt, and G. C. Smith. 1995. Growth potential of individual strains of *Listeria monocytogenes* in fresh vacuum-packaged refrigerated ground top rounds of beef. *J. Food Protect.* 58: 398～403.

[8] Berwal, J. S., and D. Dincho. 1995. Molds as protective cultures for raw dry sausages. *J. Food Protect.* 58: 817～819.

[9] Blickstad, E., and G. Molin. 1983. The microbial flora of smoked pork loin and frankfurter sausage stored in different gas atmospheres at 4 C. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 45～56.

[10] Campbell, R. J., A. F. Egan, F. H. Grau, and B. J. Shay. 1979. The growth of *Microbacterium thermosphactum* on beef. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 505～509.

[11] Cavett, J. J. 1962. The microbiology of vacuum packed sliced bacon. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 282～289.

[12] Centers for Disease Control. 1995. Outbreak of salmonellosis associated with beef jerky –New Mexico, 1995. *Morb. Mort. Wkly. Rpts.* 44: 785～788.

[13] Christopher, F. M., S. C. Seideman, Z. L. Carpenter, G. C. Smith, and C. Vanderzant. 1979. Microbiology of beef packaged in various gas atmospheres. *J. Food Protect.* 42: 240～244.

[14] Collins, M. D., U. M. Rodrigues, R. H. Dainty, R. A. Edwards, and T. A. Roberts. 1992. Taxonomic studies on a psychrophilic *Clostridium* from vacuum-packed beef: Description of *Clostridium estertheticum* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 96: 235～240.

[15] Collins, M. D., J. A. E. Farrow, B. A. Phillips, S. Ferusu, and D. Jones. 1987. Classification of *Lactobacillus divergens*, *Lactobacillus piscicola*, and some catalase-negative, asporogenous, rod-shaped bacteria from poultry in a new genus, *Carnobacterium*. *Int. J. System. Bacteriol.* 37: 310～316.

[16] Dainty, R. H., and C. M. Hibbard. 1980. Aerobic metabolism of *Brochothrix thermosphacta* growing on meat surfaces and in laboratory media. *J. Appl. Bacteriol.* 48: 387～396.

[17] Dainty, R. H., and F. J. K. Hofman. 1983. The influence of glucose concentration and culture incubation time on end-product formation during aerobic growth of *Brochothrix thermosphacta*. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 233～239.

[18] Dainty, R. H., R. A. Edwards, and C. M. Hubbard. 1989. Spoilage of vacuum-packed beef by a *Clostridium* sp. *J. Sci. Food Agric.* 49: 473～486.

[19] Deibel, R. H., and C. F. Niven, Jr. 1957. *Pediococcus cerevisiae*: A starter culture for summer sausage. *Bacteriol. Proc.*, 14～15.

[20] Deibel, R. H., C. F. Niven, Jr., and G. D. Wilson. 1961. Microbiology of meat curing. III. Some microbiological and related technological aspects in the manufacture of fermented sausages. *Appl. Microbiol.* 9: 156～161.

[21] DeKetelaere, A., D. Demeyer, P. Vanderkerckhove, and I. Vervaeke. 1974. Stoichiometry of carbohydrate fermentation during dry sausage ripening. *J. Food Sci.* 39: 297～300.

[22] Drake, S. D., J. B. Evans, and C. F. Niven, Jr. 1958. Microbial flora of packaged frankfurters and their radiation resistance. *Food Res.* 23: 291～296.

[23] Egan, A. F., B. J. Shaw, and P. J. Rogers. 1989. Factors affecting the production of hydrogen sulphide by *Lactobacillus sake* L13 growing on vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 255～262.

[24] Egan, A. F., A. L. Ford, and B. J. Shay. 1980. A comparison of *Microbacterium thermosphactum* and lactobacilli as spoilage organisms of vacuum-packaged sliced luncheon meats. *J. Food Sci.* 45: 1745～1748.

[25] Egan, A. F., and B. J. Shay. 1982. Significance of lactobacilli and film permeability in the spoilage of vacuum-packaged beef. *J. Food Sci.* 47: 1119～1122, 1126.

[26] Everson, C. W., W. E. Danner, and P. A. Hammes. 1970. Improved starter culture for semidry sausage. *Food Technol.* 24: 42～44.

[27] Freeman, L. R., G. J. Silverman, P. Angelini, C. Merritt, Jr., and W. B. Esselen. 1976. Volatiles produced by microorganisms isolated from refrigerated chicken at spoilage. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 222～231.

[28] Gardner, G. A. 1971. Microbiological and chemical changes in lean Wiltshire bacon during aerobic storage. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 645～654.

[29] Gardner, G. A., A. W. Carson, and J. Patton. 1967. Bacteriology of prepacked pork with reference to the gas composition within the pack. *J. Appl. Bacteriol.* 30: 321～333.

[30] Gardner, G. A. 1983. Microbial spoilage of cured meats. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*, ed. T. A. Roberts and F. A. Skinner, 179～202. New York: Academic Press.

[31] Gill, C. O. 1983. Meat spoilage and evaluation of the potential storage life of fresh meat. *J. Food Protect.* 46: 444～452.

[32] Gill, C. O., and K. G. Newton. 1979. Spoilage of vacuum-packaged dark, firm, dry meat at chill temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 362～364.

[33] Giolitti, G., C. A. Cantoni, M, A. Bianchi, and P. Renon. 1971. Microbiology and chemical changes in raw hams of Italian type. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 51～61.

[34] Grant, G. F., A. R. McCurdy, and A. D. Osborne. 1988. Bacterial greening in cured meats: A review. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21: 50～56.

[35] Hanna, M. O., C. Vanderzant, G. C. Smith, and J. W. Savell. 1981. Packaging of beef loin steaks in 75% O_2－25% CO_2. II. Microbiological properties. *J. Food Protect.* 44: 928～933.

[36] Hanna, M. O., G. C. Smith, L. C. Hall, and C. Vanderzant. 1979. Rold of *Hafnia alvei* and a *Lactobacillus* species in the spoilage of vacuum-packaged strip loin steaks. *J. Food Protect.* 42: 569～571.

[37] Hanna, M. O., C. Vanderzant, Z. L. Carpenter, and G. C. Smith. 1977. Characteristics of psychrotrophic, gram-positive, catalase-positive, pleomorphic coccoid rods from vacuumpackaged wholesale cuts of beef. *J. Food Protect.* 40: 94～97.

[38] Hanna, M. O., C. Vanderzant, Z. L. Carpenter, and G. C. Smith. 1977. Microbial flora of vacuum-packaged lamb with special reference to psychrotrophic, gram-positive, catalasepositive pleomorphic rods. *J. Food Protect.* 40: 98～100.

[39] Harris, D. A., L. Chaiet, R. P. Dudley, and P. Ebert. 1957. The development of a commercial starter culture for summer sausages. *Bacteriol. Proc.*, 15.

[40] Hauschild, A. H. W., and R. Hilsheimer. 1983. Prevalence of *Clostridium botulinum* in commercial liver sausage. *J. Food Protect.* 46: 243～244.

[41] Hauschild, A. H. W., L. M. Poste, and R. Hilsheimer. 1985. Toxin production by *Clostridium botulinum* and organoleptic changes in vacuum-packaged raw beef. *J. Food Protect.* 48: 712～716.

[42] Henry, K. G., J. W. Savell, G. C. Smith, J. G. Ehlers, and C. Vanderzant. 1983. Physical, sensory and microbiological characteristics of lamb retail cuts vacuum packaged in high oxygen-barrier film. *J. Food Sci.* 48: 1735～1740, 1749.

[43] Hitchener, B. J., A. F. Egan, and P. J. Rogers, 1982. Characteristics of lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 31～37.

[44] Holley, R. A. 1985. Beef jerky: Fate of *Staphylococcus aureus* in marinated and corned beef during jerky manufacture and 2.5℃ storage. *J. Food Protect.* 48: 107～111.

[45] Holzapfel, W. H., and E. S. Gerber. 1983. *Lactobacillus divergens* sp. nov., a new heterofermentative *Lactobacillus* species producing L (+) -lactate. *System. Appl. Bacteriol.* 4: 522～534.

[46] Ingram, M. 1960. Bacterial multiplication in packed Wiltshire bacon. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 206～215.

[47] Kalchayanand, N., B. Ray, and R. A. Field. 1993. Characteristics of psychrotrophic *Clostridium laramie* causing spoilage of vacuum-packaged refrigerated fresh and roasted beef. *J. Food Protect.* 56: 13～17.

[48] Kalchayanand, N., B. Ray, R. A. Field, and M. C. Johnson. 1989. Spoilage of vacuumpackaged

refrigerated beef by *Clostridium*. *J. Food Protect.* 52: 424～426.

[49] Kempton, A. G., and S. R. Bobier. 1979. Bacterial growth in refrigerated, vacuum-packed luncheon meats. *Can. J. Microbiol.* 16: 287～297.

[50] Kitchell, A. G. 1962. Micrococci and coagulase negative staphylococci in cured meats and meat products. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 416～431.

[51] Kraft, A. A., V. Reddy, R. J. Hasiak, K. D. Lind, and D. E. Galloway. 1982. Microbiological quality of vacuum packaged poultry with or without chlorine treatment. *J. Food Sci.* 47: 380～385.

[52] Lawrie, R. A. 1966. *Meat Science*. New York: Pergamon Press.

[53] Lee, M. L., D. L. Smith, and L. R. Freeman. 1979. High-resolution gas chromatographic profiles of volatile organic compounds produced by microorganisms at refrigerated temperatures. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 85～90.

[54] Lee, B. H., R. E. Simard, C. L. Laleye, and R. A. Holley. 1984. Shelf-life of meat loaves packaged in vacuum or nitrogen gas. I. Effect of storage temperature, light and time on the microflora change. *J. Food Protect.* 47: 128～133.

[55] McMeekin, T. A. 1975. Spoilage association of chicken breast muscle. *Appl. Microbiol.* 29: 44～47.

[56] Mead, G. C. 1983. Effect of packaging and gaseous environment on the microbiology and shelf life of processed poultry products. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*. ed. T. A. Roberts and F. A. Skinner, 203～216. New York: Academic Press.

[57] Miller, A., III, R. A. Scanlan, J. S. Lee, and L. M. Libey. 1973. Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas putrefaciens*, *Pseudomonas fluorescens*, and an *Achromobacter* species. *Appl. Microbiol.* 26: 18～21.

[58] Miller, A., III. R. A. Scanlan, J. S. Lee, L. M. Libbey, and M. E. Morgan. 1973. Volatile compounds produced in sterile fish muscle (*Sebastes melanops*) by *Pseudomonas perolens*. *Appl. Microbiol.* 25: 257～261.

[59] Mol. J. H. H., J. E. A. Hietbrink, H. W. M. Mollen, and J. van Tinteren. 1971. Observations on the microflora of vacuum packed sliced cooked meat products. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 377～397.

[60] Newsome, R. L., B. E. Langlois, W. G. Moody, N. Gay, and J. D. Fox. 1984. Effect of time and method of aging on the composition of the microflora of beef loins and corresponding steaks. *J. Food Protect.* 47: 114～118.

[61] Newton, K. G., J. C. L. Harrison, and K. M. Smith. 1977. The effect of storage in various gaseous atmospheres on the microflora of lamb chops held at −1℃. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 53～59.

[62] Newton, K. G., and W. J. Rigg. 1979. The effect of film permeability on the storage life and microbiology of vacuum-packed meat. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 433～441.

[63] Nicol, D. J., M. K. Shaw, and D. A. Ledward. 1970. Hydrogen sulfide production by bacteria and sulfmyoglobin formation in prepacked chilled beef. *Appl. Microbiol.* 19: 937～939.

[64] Nielsen, H. -J. S. 1983. Influence of nitrite addition and gas permeability of packaging film on the microflora in a sliced vacuum-packed whole meat product under refrigerated storate. *J. Food Technol.* 18: 573～585.

[65] Nielsen, H. -J. S. and P. Zeuthen. 1985. Influence of lactic acid bacteria and the overall flora on development of pathogenic bacteria in vacuum-packed, cooked emulsion-style sausage. *J. Food Protect.* 48: 28～34.

[66] Niinivaara, F. P., M. S. Pohja, and S. E. Komulainen. 1964. Some aspects about using bacterial pure cultures in the manufacture of fermented sausages. *Food Technol.* 18: 147～153.

[67] Palumbo, S. A., J. L. Smith, and S. A. Kerman. 1973. Lebanon bologna. I. Manufacture and processing. *J. Milk Food Technol.* 36: 497～503.

[68] Paradis, D. C., and M. E. Stiles. 1978. A study of microbial quality of vacuum packaged, sliced bologna. *J. Food Protect.* 41: 811～815.

[69] Patterson, J. T., and P. A. Gibbs. 1977. Incidence and spoilage potential of isolates from vacuum-packaged meat of high pH value. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 25～38.

[70] Pearson, A. M., and F. W. Tauber. 1984. *Processed Meats*, 2d ed. Westport, CT: AVI.

[71] Pederson, C. S. 1979. *Microbiology of Food Fermentations*, 2d ed. Westport, CT: AVI.

[72] Potter, M. E., M. B. Kruse, M. A. Matthews, R. O. Hill, and R. J. Martin. 1976. A sausageassociated outbreak of trichinosis in Illinois. *Amer. J. Pub. Hlth.* 66: 1194～1196.

[73] Riha, W. E., and M. Solberg. 1970. Microflora of fresh pork sausage casings. 2. Natural casings. *J. Food Sci.* 35: 860～863.

[74] Roth, L. A., and D. S. Clark. 1975. Effect of lactobacilli and carbon dioxide on the growth of *Microbacterium thermosphactum* of fresh beef. *Can. J. Microbiol.* 21: 629～632.

[75] Savell, J. W., M. O. Hanna, C. Vanderzant, and G. C. Smith. 1981. An incident of predominance of *Leuconostoc* sp. in vacuum-packaged beef strip loins—sensory and microbial profile of steaks stored in O_2-CO_2-N_2 atmospheres. *J. Food Protect.* 44: 742～745.

[76] Seelye, R. J., and B. J. Yearbury. 1979. Isolation of *Yersinia enterocolitica*-resembling organisms and *Alteromonas putrefaciens* from vacuum-packaged chilled beef cuts. *J. Appl. Bacteriol.* 46: 493～499.

[77] Seideman, S. C., C. Vanderzant, G. C. Smith, M. O. Hanna, and Z. L. Carpenter. 1976. Effect of degree of vacuum and length of storage on the microflora of vacuum packaged beef wholesale cuts. *J. Food Sci.* 41: 738～742.

[78] Seideman, S. C., and P. R. Durand. 1983. Vacuum packaging of fresh beef: A review. *J. Food Qual.* 6: 29～47.

[79] Seman, D. L., K. R. Drew, and R. P. Littlejohn. 1989. Packaging venison for extended chilled storage: Comparison of vacuum and modified atmosphere packaging containing 100% carbon dioxide. *J. Food Protect.* 52: 886～893.

[80] Shaw, B. G., and C. D. Harding. 1984. A numerical taxonomic study of lactic acid bacteria from vacuum-packed beef, pork, lamb and bacon. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 25～40.

[81] Shay, B. J., and A. F. Egan. 1981. Hydrogen sulphide production and spoilage of vacuumpackaged beef by a *Lactobacillus*. in *Psychrotrophic Micro-organisms in Spoilage and Pathogenicity*, ed. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian, and N. Skovgaard. 241～251. London: Academic Press.

[82] Shelef, L. A. 1977. Effect of glucose on the bacterial spoilage of beef. *J. Food Sci.* 42: 1172～1175.

[83] Simard, R. E., B. H. Lee, C. L. Laleye, and R. A. Holley. 1983. Effects of temperature,

light and storage time on the microflora of vacuum-or nitrogen-packed frankfurters. *J. Food Protect.* 46: 199～205.

[84] Smith, J. L., and S. A. Palumbo. 1973. Microbiology of Lebanon bologna. *Appl. Microbiol.* 26: 489～496.

[85] Stanley, G., K. J. Shaw, and A. F. Egan. 1981. Volatile compounds associated with spoilage of vacuum-packaged sliced luncheon meat by *Brochothrix thermosphacta*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 816～818.

[86] Stewart, A. W. 1983. Effect of cooking on bacteriological population of "soul foods." *J. Food Protect.* 46: 19～20.

[87] Surkiewicz, B. F., M. E. Harris, R. P. Elliott, J. F. Macaluso, and M. M. Strand. 1975. Bacteriological survey of raw beef patties produced at establishments under federal inspection. *Appl. Microbiol*, 29: 331～334.

[88] Sutherland, J. P., J. T. Patterson, and J. G. Murray. 1975. Changes in the microbiology of vacuum-packaged beef. *J. Appl. Bacteriol.* 39: 227～237.

[89] Tonge, R. J., A. C. Baird-Parker, and J. J. Cavett. 1964. Chemical and microbiological changes during storage of vacuum packed sliced bacon. *J. Appl. Bacteriol.* 27: 252～264.

[90] Urbaniak, L., and W. Pezacki. 1975. Die Milchsäure bildende Rohwurst-Mikroflora und ihre technologisch bedingte Veränderung. *Flelschwirtschaft* 55: 229～237.

[91] Vanderzant, C., M. O. Hanna, J. G. Ehlers, J. W. Savell, G. C. Smith, D. B. Griffin, R. N. Terrell, K. D. Lind, and D. E. Galloway. 1982. Centralized packaging of beef loin steaks with different oxygen-barrier films: Microbiological characteristics. *J. Food Sci.* 47: 1070～1079.

[92] Wardlaw, F. B., G. C. Skelley, M. G. Johnson, and J. C. Acton. 1973. Changes in meat components during fermentation, heat processing and drying of a summer sausage. *J. Food Sci.* 38: 1228～1231.

[93] Whiteley, A. M., and M. D. D'Souza. 1989. A yellow discoloration of cooked cured meat products—isolation and characterization of the causative organism. *J. Food Protect.* 53: 392～395.

6. 水产品

本部分内容所引用的术语“水产品”包括一切来自于淡、咸水或温、冷水域的鳍鱼类、甲壳类及头足纲软体动物类。一般来说，新鲜水产品中的菌相构成可以反映其捕获水域的微生物存在状况。与肉食动物一样，健康鱼的组织内部是无菌的。对鱼而言，微生物一般存在于三个地方，即外层黏液、鱼鳃及鱼体的肠内。淡水或温水鱼与冷水鱼在菌相上的差异性在于：前者菌相中含较多的嗜温型革兰氏阳性菌，而后者含大量的革兰氏阴性菌（海水中固有的菌是革兰氏阴性菌）。

组成水产品中菌相的微生物种类可见表 6.1，它们相互作用导致产品腐败的原理将在水产品腐败这一部分进行讨论。

表 6.1 新鲜、腐败鱼及其它水产品中常见的细菌、酵母和霉菌

细　菌	革兰氏阳/阴性	检出频率	酵　母	检出频率	霉　菌	检出频率
不动细菌	−	×	假丝酵母	××	曲霉属	×
产气单胞菌	−	×	罗氏隐球酵母	××	出芽短梗霉	××
产碱杆菌	−	×	德巴利氏酵母	×	青霉属	×
芽孢杆菌	+	×	汉逊氏酵母	×	帚霉	×
棒杆菌	+	×	毕赤氏酵母	×		
肠道菌	−	×	红酵母	××		
大肠杆菌	−	×	掷孢酵母	×		
黄杆菌	−	×	丝孢酵母	×		
乳酸菌	+	×				
李斯特菌	+	×				
微杆菌	+	×				
摩氏杆菌		×				
假单胞菌	−	××				
嗜冷菌	−	×				
Shewanella	−	××				
弧菌属		××				
weissella	+	×				

6.1 各种新鲜及冷冻水产品的微生物特性

如上所述，捕获水域的卫生状况是影响产品微生物质量的关键。除了水源，各个加

工过程，诸如剥皮、去壳、去内脏、拌粉等都会造成微生物的污染。

通过对 91 个不同种类虾样品的研究，Silverman 等人[34]发现：除一例外，所有预煮样品其总菌数<lg4.00/g。对样品原料，59%样品总菌数低于 lg5.88/g，而 31%样品低于 lg5.69/g。对 204 种去壳、预煮及冷冻的虾样品进行检测，52%样品总菌数小于 lg4.70/g，71%样品总菌数小于 lg5.30/g[23]。表 6.2 列出了各种水产品的微生物指标。

表 6.2　　各种水产品的微生物指标

产　品	样品数	微生物种类与指标	满足指标的样品量/%	参考文献
冷冻鲑鱼片	41	32℃APC≤10^5/g 大肠菌群 MPN<3/g 金黄色葡萄球菌 MPN<3/g	100	11
冷冻鲑鱼片	43	32℃APC≤10^5/g 大肠菌群 MPN<3/g 金黄色葡萄球菌 MPN<3/g	98	11
新鲜蛤	53	32℃APC≤10^5/g 大肠菌群 MPN<3/g 金黄色葡萄球菌 MPN<3/g	53 51 91	11
鲜牡蛎	59	30℃APC≤10^7/g 大肠菌群 MPN<1100/g 金黄色葡萄球菌 MPN<3/g	49 22 90	11
去壳牡蛎 （零售）	1337	30℃APC≤10^6/g 大肠菌群 MPN≤460/g 粪肠杆菌 MPN≤460/g	51 94 96	45
蓝色蟹肉 （零售）	896	30℃APC≤10^6/g 大肠菌群 MPN≤1100/g 埃希氏大肠菌群 MPN<3/g 金黄色葡萄球菌 MPN≤1100/g	61 93 97 94	45
硬壳蛤 （批发）	1124 1130 161	30℃APC≤10^6/g 大肠菌群 MPN≤460/g 粪肠杆菌 MPN<3/g	99.8 96 91	45
软壳蛤 （批发）	351 363 75	30℃APC≤10^6/g 大肠菌群 MPN≤460/g 粪肠杆菌 MPN<3/g	96 98 72	45
去壳虾 （生）	1468	30℃APC≤10^7/g 大肠菌群 MPN≤64/g 埃希氏大肠菌群 MPN<3/g 金黄色葡萄球菌 MPN≤64/g	94 97 97 97	38
去壳虾 （熟）	1464	30℃APC≤10^5/g 大肠菌群 MPN<3/g 埃希氏大肠菌群 MPN<3/g 金黄色葡萄球菌 MPN<3/g	81 86 99 99	38
龙虾尾 （生、冷冻）	1315	30℃APC≤10^6/g 大肠菌群 MPN≤64/g 埃希氏大肠菌群 MPN<3/g 金黄色葡萄球菌 MPN<3/g	74 91 95 76	38

续表

产　品	样品数	微生物种类与指标	满足指标的样品量/%	参考文献
零售冷冻拌粉的生虾	27	30℃APC≤6.00/g	52	41
		大肠菌群 MPN≤3.00/g	100	
		存在埃希氏大肠菌群	4	
		存在金黄色葡萄球菌	59	
鲜河鲶	335	APC<7.00/g	93	4
		粪肠杆菌 2.60/g	70.7	
		存在沙门氏菌	4.5	
冷冻河鲶	342	APC≤7.00/g	94.5	4
		粪肠杆菌 2.60/g	92.4	
		存在沙门氏菌	1.5	
冷冻、熟去壳虾	204	APC<4.70/g	52	23
		APC≤5.30/g	71	
		大肠菌群无或<0.3/g	52.4	
		大肠菌群<3/g	75.2	

对鳕鱼片生产质量的跟踪研究发现：绝大部分的微生物污染发生于切片至包装的各个加工过程中[28]。对某一特定的加工企业，研究者发现，鳕鱼片总菌数早上为 lg5.61/g，中午达 lg5.65/g，而到晚上达到 lg5.94/g。根据他们的研究，其它公司的情况也大致如此。对去壳的软壳蛤、蚌，从早上至晚上其微生物数量增长情况也已证实基本符合这一情形。黑线鳕鱼片和软壳蛤的平均梭菌数均小于 2/g，细微的差别在于蛤中这类菌的数量稍高于黑线鳕鱼片。工业化生产的新鲜鲈鱼片其总菌数平均为 lg5.54/g，其酵母和霉菌数量约为 lg2.69/g。

根据捕获水域的情况可以预测蛤类所含的微生物的数量和种类。从美国佛罗里达州海岸来的 60 个蛤样品，43%含沙门氏菌，牡蛎中该菌含量也达 2.2/100g 牡蛎肉[42]。已证实，鼠伤寒沙门氏菌比大肠杆菌更易“滞留”在硬壳蛤类中[40]。

对取自甲板的太平洋虾进行菌相分析，摩氏杆菌属菌占 30%～60%，接下去分别是假单胞菌Ⅰ型和Ⅱ型（占 8%～22%），不动细菌属菌（4%～24%），黄杆菌属-噬胞菌属菌（7%～16%），以及假单胞菌Ⅲ和Ⅳ型（8%～22%）。但在漂洗及机器去壳工序中，不动细菌属菌占 16%～35%，假单胞菌Ⅲ和Ⅳ型占 2%～76%，黄杆菌-噬胞菌属占 3%～37%[22]。鲜鱼片的最初菌相构成中占主导的是 *S. putrefqciens* 和假单胞菌；在 2℃下，以后者为主，在 2～15℃下，以 *S. putrefqciens* 为主[27]。在 287 例零售的新鲜鱼和贝类样品产气荚膜梭状芽孢杆菌检测中，10%为阳性[2]。新捕的虾中已证实含少量的单核细胞增生李斯特菌（见第七部分 22）。

通常冷冻水产品和其它冷冻品的细菌数要比类似新鲜产品的低。对 597 例从零售市场采集的新鲜和冷冻水产品进行有氧平板计数（APC），240 例冷冻样品的菌数几何平均值为 lg3.54～lg4.97/g，而 357 例新鲜品的菌数几何平均值为 lg4.89～lg8.43/g[11]。大肠杆菌群值，对冷冻品其几何平均最大可能值（MPN）为 1～7.7/g，对鲜品为 7.78～4800/g。用 MPN 法，597 例样品中只有 4.7%为大肠杆菌阳性，7.9%为金黄色葡萄球菌

阳性，2%为产气荚膜杆菌阳性，对沙门氏菌和副溶血性弧菌的结果均为阴性（表 6.2）。

对水产品而言，35℃培养时平板计数结果通常要比在 30℃时培养的低。这个结论是 Wentz 等人[45]以新鲜蟹肉、蛤类及牡蛎为实验对象得出的。896 个蟹肉样品的 APC 平均值在 35℃培养时为 lg5.15，而在 30℃培养为 lg5.72；1337 个去壳牡蛎样品，35℃培养为 lg5.59，30℃培养为 lg5.95；358 例软壳蛤样品，35℃培养 APC 值为 lg2.88，30℃培养为 lg4.43。这规律对带壳生虾及冷冻龙虾尾原料也同样适用。带壳生虾样品 APC 的几何平均值在 35℃培养下为 lg5.48，在 30℃培养下为 lg5.90；冷冻龙虾尾样品 35℃下培养为 lg4.62，而 30℃培养下为 lg5.15[38]。

6.2 发酵鱼类

发酵鱼类在亚洲的部分地区相当流行。与西方相比，那里人们摄入的膳食蛋白质更多地来自于水产品。在第三部分 7 中有更多有关发酵的论述。下面主要讨论两类发酵水产品——鱼酱油和鱼酱（pastes）。

在东南亚，鱼酱油是一种颇为流行的产品，并有各种各样的人们熟知的产品名称，例如 ngapi（缅甸），nuoc-mam（柬埔寨和越南），nam-pla（老挝和泰国），ketjap-ikan（印尼）等等。一些鱼酱油的生产，先按大约 1∶3（盐∶鱼）的比例将盐加至未去内脏的鱼中，然后将盐渍的鱼移至以混凝土制成的发酵缸中，发酵缸通常建于地下。或将鱼放置于陶质罐中并埋于地下。缸或罐装满后密封至少 6 个月，以使鱼体液化自溶。收集液体，过滤，然后移至陶器中，在阳光下进行 1～3 个月的成熟。最终成品具清亮的黑棕色，并具特殊的芳香风味[30]。对泰国鱼酱油发酵过程进行研究后发现：食盐含量在 30%左右时，经过大于 12 个月的发酵，产品的 pH 从开始至结束变化范围在 6.2～6.6[30]。这些工艺参数以及相对较高的发酵温度使这类产品中生长的主导菌主要是一些形成芽孢的需氧性嗜盐菌。少量的链球菌、小球菌、葡萄球菌属以及芽孢杆菌，显然与产品的风味和芳香气有关。毫无疑问，一部分的液化作用是由鱼体蛋白酶引起的。虽然发酵温度和 pH 是在大量非必需菌的适宜生长范围，但 30%～33%的食盐浓度保证了这类产品的安全性。

鱼酱在东南亚同样流行，但这类产品中发酵菌所起作用是很小的。连同其它许多发酵鱼，鱼酱和鱼酱油产品有以下几种：中国的虾酱，柬埔寨的鱼露（mamruoc），印度尼西亚的 bladchan，日本的 shiokara，马来西亚的 balachan，菲律宾的 bagoong，泰国的 kapi，hoi-dong 及 pla-mam，非洲的 fessik 和泰国的 nam-pla。VanVeen 和 Steinkraus[42]和 Sundhagul 等[37]在文中对上述的某些产品及东南亚其它鱼产品进行了综述和研讨。

6.3 鱼和贝类的腐败

6.3.1 鱼

海水鱼和淡水鱼都有较高水平的蛋白质及其他含氮化合物（表 6.3）。这些鱼中不含碳水化合物，而脂肪含量根据鱼的品种，有的很高，有的又很低。鱼体中含氮化合物的

性质是相当重要的。表 6.4 中列出了几种鱼的总氮及蛋白质氮的含量（质量分数）。从表中可见，鱼体中所有含氮化合物并非都以蛋白质形式存在。非蛋白质氮由游离氨基酸、氨和三甲氨等一些挥发性盐基氮、肌酸、牛磺酸、甜菜碱、尿酸、鹅肌肽、肌肽和组氨酸等组成。

表 6.3　　鱼和甲壳类的化学成分含量　　单位：%

	水	碳水化合物	蛋白质	脂肪	灰分
多刺鱼					
鲑鱼	74.6	0	20.5	4.0	1.2
鳕鱼	82.6	0	16.5	0.4	1.2
黑线鳕	80.7	0	18.2	0.1	1.4
大比目鱼	75.4	0	18.6	5.2	1.0
鲱鱼（美国亚特兰大）	67.2	0	18.3	12.5	2.7
鲭鱼（美国亚特兰大）	68.1	0	18.7	12.0	1.2
大麻哈鱼（太平洋）	63.4	0	17.4	16.5	1.0
剑鱼	75.8	0	19.2	4.0	1.3
甲壳类					
蟹	80.0	0.6	16.1	1.6	1.7
龙虾	79.2	0.5	16.2	1.9	2.2
软体动物类					
蛤肉	80.3	3.4	12.8	1.4	2.1
牡蛎	80.5	5.6	9.8	2.1	2.0
扇贝	80.3	3.4	14.8	0.1	1.4

表 6.4　　鱼和甲壳类中氮的分布　　单位：%

种类	总氮含量	蛋白质氮含量	蛋白氮/总氮
鳕鱼（美国亚特兰大）	2.83	2.47	0.87
鲱鱼（美国亚特兰大）	2.90	2.53	0.87
沙丁鱼	3.46	2.97	0.86
黑线鳕	2.85	2.48	0.87
龙虾	2.72	2.04	0.75

已知的导致鱼体腐败的微生物列于表 6.1，新鲜冷冻鱼的腐败通常由细菌引起，而咸鱼及干鱼品由真菌引起腐败的可能性更大。造成鱼腐败的菌由一些无芽孢的革兰氏阴性的假单胞菌及不动细菌-摩氏杆菌属细菌组成。许多导致鱼腐败的细菌能在 0～1℃之间良好生长，Shaw 和 Shewan[31]发现：在－3℃下许多假单胞菌属中的细菌可以较缓的速度

使鱼发生腐败。

海水鱼和淡水鱼的腐败方式似乎相同，主要区别在于：海水环境不一造成使海水鱼腐败的菌有差别，以及就非蛋白质氮而言，各种鱼的化学成分也有差异。最易污染的鱼体部位是鱼的鳃区，包括鳃。通过检查鱼鳃的臭味可作为早期腐败开始的征兆。饱食之鱼如不及时去除内脏，肠内细菌不久便可透过肠壁进入腹腔肉中。自溶蛋白酶参与了这一过程，这些酶是鱼肠内固有的酶或肠内微生物产生的酶，或二者皆有。造成鱼腐败的细菌很容易生长在鱼体外的黏液及表皮中。黏液的成分由黏多糖、游离氨基酸、氧化三甲胺哌啶类衍生物及其它相关物质组成。同家禽腐败检测方法一样，平板计数是鱼体表面菌数检测的有效方法，细菌数可表示为“个/cm^2 检测表面。”

腐败微生物似乎首先利用简单化合物，并产生各种挥发性的臭味成分。据 Shewan[33] 报道：氧化三甲胺、肌酸、牛磺酸、鹅肌肽以及相关的化合物和某些氨基酸在腐败过程中被降解，产生三甲胺、氨、组胺、硫化氢、吲哚和其它化合物。在自溶方面，鱼肉和哺乳动物肉有所差异。鱼肉似乎以较快的速度经历自溶过程。虽然一些研究者为支持他们对腐败菌和腐败过程研究的结论都假定自溶过程与微生物的腐败有关[13]，试图将这两件事隔离、孤立起来看来是困难的。避开考虑导致鱼正常腐败的能力，以无菌鱼肌肉汁为研究材料，Lerke 等人[25]的研究表明：引起变质的微生物属于假单胞菌和不动细菌-摩根氏菌属中的细菌，而无棒状杆菌、小球菌或黄杆菌存在。就它们分解利用特定化合物的能力而言，研究者发现大多数引起腐败的菌无降解动物胶质或消化白蛋白的能力。这意味着鱼腐败过程与牛肉非常相近——通常缺乏腐败菌对蛋白质完全水解的能力。将腐败菌接种于鳕鱼和黑线鳕肌肉块中，并进行培养，其结果也证实腐败菌不能将组织软化[13]。鲱鱼、鲭鱼、沙丁鱼及其他一些高脂质的鱼，在微生物腐败发生同时，也会发生酸败现象。因为鱼体表皮富含胶质成分，而大多数鱼的鳞是由属于角质蛋白的硬蛋白组成的，因此，这些部位都是鱼体中最后被分解的部位。

早期有关腐败鱼体中细菌菌群之间相互作用的研究表明：在 5℃下，经过 14d 其主导菌是 *shewan's* Ⅱ 中的假单胞菌（表 6.5）。*Shewan's* Ⅰ，Ⅱ和Ⅲ似乎分别表示荧光假单胞菌，莓实假单胞菌和腐败假单胞菌。在近期的研究中，对 159 株从变质淡水鱼中分离得到的革兰氏阴性菌进行分析，大约 46%的为假单胞菌，约 38%为 *shewanella*，该变质鱼样品的含菌数约为 10^8cfu/g[35]。因为后者可产生 H_2S 和还原氧化三甲胺（TMAO），所以它们被认为是最重要的引起鱼腐败变质的细菌。

表 6.5　　太平洋狗鳕在 5 ℃贮存时微生物数量的变化

微　生　物	培养后微生物数量/%			
	0d	5d	8d	14d
假单胞菌				
Ⅰ型	14.0	7.3	2.7	15.1
Ⅱ型	14.0	52.4	53.4	77.4
Ⅱ和Ⅳ	3.5	12.2	31.5	7.5

续表

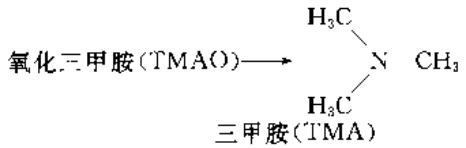
微 生 物	培养后微生物数量/%			
	0d	5d	8d	14d
不动细菌-摩氏杆菌				
不动细菌	31.6	17.0	8.2	0
摩氏杆菌	19.3	9.8	2.7	0
黄杆菌	17.6	0	0	0
大肠杆菌	0	1.2	1.4	0
样品总菌数	1.5×10^4	3.4×10^7	9.3×10^8	2.7×10^9
鉴定的微生物数*	57	82	73	53

* 在分离平板上分离出的所有菌落挑出后鉴定。

对 4 种不同鱼种表皮细菌菌相研究表明下列菌是最为常见的菌：假单胞菌——*Alteromonas*，32%～60%；摩氏杆菌——不动细菌属菌，18%～37%[14]。鲱鱼片的最初菌相构成中占主导的是 *S. putrefqciens* 和假单胞菌，在空气中腐败后这些菌可占菌相构成中的 62%～95%[27]。然而当鲱鱼片在 100% CO_2 环境、4℃下发生变质时，其菌相构成中几乎完全由乳酸菌组成[27]。在 4℃，80%CO_2、20%空气环境下贮存 21d 的鳕鱼片，其菌相构成中 71%～87%由乳酸菌和一些棕褐色的假单胞菌组成[16]。

表 5.3 中所列的是一些在腐败鱼中产生的挥发性化合物。由 Chen 等[8]和 Chen 及 Levin[7]命名的“无色杆菌”（*Achromo bacter*）在鱼体中会产生苯乙醇。从保存于 2℃的黑线鳕中得到的高沸点组分中可检测出苯乙醇及酚类化合物。在相似条件下，10 株已知的不动细菌属菌中无一产生苯乙醇，9 株已知的摩根氏菌中只有 1 株产生苯乙醇。乙醇、丙醇和异丙醇均可由鱼类腐败菌产生。对腐败鱼抽提物进行检测后发现：244 株从沙丁鱼和鳟鱼中分离得到的细菌均产生乙醇，241 株（98.8%）产生异丙醇，227（93%）产生丙醇[3]。

在某些场合，氧化三甲胺（TMAO）变成三甲胺（TMA）这一还原反应可成功地检测鱼的微生物变质状况：



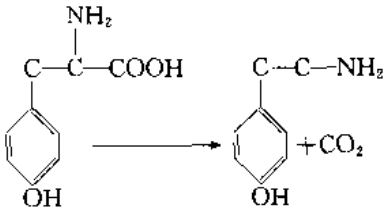
TMAO 是海水鱼中的一种正常成分，而在新鲜捕获的鱼体内很少或几乎不含 TMA。虽然有些鱼含肌肉组织蛋白酶可还原 TMAO，但 TMA 的存在通常被认为是由微生物引起的。一些 TMAO 也可能进一步还原成二甲胺。各种细菌还原 TMAO 至 TMA 的能力是不同的，并且 pH 对还原作用也有影响。检测 TMA 的方法是：先用甲苯和 KOH 进行抽提，然后与苦味酸反应或将其从抽提物中洗脱出来，并进一步用 $KMnO_4$ 溶液抽提[10,39]。近来气相色谱法被用来检测顶隙 TMA，在 5min 内可完成取样及检测分析，其结果与感观检验的结果相一致[20]。

组胺、联氨和总挥发性物质也被用作鱼类腐败的指标。组胺是由微生物产生的组胺脱羧酶分解组氨酸产生的，如下：

$$\text{组氨酸} \xrightarrow{\text{组胺脱羧酶}} \text{组胺}$$

组胺与鲭鱼中毒有关（将在第七部分 28 进一步讨论）。尸胺和腐胺可作为评定腐败的重要指标，已用于鱼、肉和家禽的腐败评定。

某些引起鱼腐败的微生物可产生酪胺，据报道：从真空包装的糖-盐腌制鱼中分离的鱼肉食杆菌和 *Weissella viridescens* 菌有此能力[24]。通常这些产品在冷冻条件下保存 2～4 周后，其乳酸菌的数量可达 lg（7～8）cfu/g，贮存温度从 9℃降至 4℃可减缓产生酪氨的反应[24]。酪氨酸脱羧产生酪胺：



总的挥发性化合物包括总挥发性碱（TVB）、总挥发性酸（TVA）、总挥发性物质（TVS）和总挥发性氮（TVN）。TVB 包括 NH_3、二甲胺和三甲胺；TVN 包括 TVB 和其他样品中由蒸汽蒸馏得到的氮化合物；TVS 是指那些可从产品中挥发的，可还原 $KMnO_4$ 溶液的化合物。由于后者具还原性，有时将其归类于挥发性还原物质（VRS）。TVA 包括乙酸、丙酸和相关的有机酸。在澳大利亚和日本已将 TVN 作为虾的质量指标，合格产品的产品质量标准是：TVN 小于 30mg/100g 及三甲胺含量小于 5mg/100g，即虾类产品的 TVN 值超出 30mg/100g 时是其变质的明确界限[9]。一项研究发现：如每百克低脂海水鱼中含约 45mg TVB-N，其对应的鱼相当于约 10000ng 的脂多糖[36]。用这些方法测定鱼新鲜度的优点在于它们不仅仅考虑某一单一的代谢变化过程，缺点是它们缺乏测定初期腐败的能力。

6.3.2　贝类

6.3.2.1　甲壳类

甲壳类水产品中，虾、龙虾、蟹及螯虾是最常见的消费品种。除特殊外，该类中的每一品种其腐败方式基本相似。这类食品在腐败上存在的主要差异，通常与其被处理的方法和它们的特殊化学成分有关。

与鱼中不含碳水化合物相反，甲壳纲类水产中含有约 0.5%的碳水化合物（表 6.3），虾比鱼含有更高含量的游离氨基酸，并含有类似于组织蛋白酶的酶，该酶可快速分解蛋白质。

捕获的甲壳纲类水产品的细菌菌相应可以反映其捕获水域的微生物分布，船甲板、起吊设备及清洗水对其的污染情况。许多新鲜鱼中存在的微生物同样也存在于这类食品中，引起该类产品腐败变质的菌种主要有假单胞菌、不动细菌-摩氏杆菌属和酵母等。在 0℃下，贮存 13d 后变质的虾中假单胞菌是主导菌，其腐败菌中只有 2%是革兰氏阳性菌，与此相对照的是新鲜产品中革兰氏阳性菌占 38%[26]。虾在 5.6℃和 11.1℃下腐败时，其腐

败菌主要是摩氏杆菌，在 16.7℃和 22.2℃时引起变质的腐败菌主要是变形杆菌（表 6.6）。

表 6.6 变质虾中的主导菌

温度/℃	贮存天数/d	微 生 物
0	13	假单胞菌
5.6	9	摩氏杆菌
11.1	7	摩氏杆菌
16.7	3	变形杆菌
22.2	3	变形杆菌

甲壳类的腐败与鱼的腐败形式相当类似。由于组织结构的原因，甲壳类水产肉的腐败似乎可预期从其外表面开始。有报导称：甲壳类每百克肌肉的含氮量超过 300mg，这数值大大高于鱼肉[43]。尤其是甲壳类水产肉中含有较多的游离氨基酸和氮溶出物，这些特点使得它们对腐败微生物的侵袭相当敏感。与鱼腐败的情形很相似，甲壳类水产肉的最初腐败通常伴随着大量挥发性盐基氮的产生。某些挥发性盐基氮的产生是由存在于甲壳类水产中的氧化三甲胺还原而成的。肌酸在甲壳类和软体动物类中均较缺乏，而精氨酸是普遍存在的。同肉和家禽相似，虾在微生物腐败产生的同时伴有水合能力（hydratian capacitg）的提高[32]。

6.3.2.2 软体动物

本节中软体动物（molluscan slellfish）是指牡蛎、蛤、鱿鱼和扇贝。这些生物与硬骨鱼和甲壳纲类在化学成分上的差异性体现在：它们的肌肉中含一定量的碳水化合物，并且其总氮含量较低。所含碳水化合物又主要以糖原形式存在，存在形式不同，含量水平也不同。因此，可能发生发酵作用。而后者是微生物腐败的一种方式。同其它甲壳类水产一样，软体动物的肉中含较高量的盐基氮。特别有意思的是：软体动物肌肉组织中游离精氨酸、天门冬氨酸和谷氨酸的含量比鱼中还高。甲壳纲类和软体动物在化学成分上一个重要的差别是后者含更高量的碳水化合物。例如，蛤肉和扇贝含 3.4%的碳水化合物，而牡蛎含 5.6%，且大多以糖原形式存在。软体动物碳水化合物含量较高是这类食品腐败类型有别于其它水产品的主要原因。

软体动物的微生物菌相变化非常大，这取决于其捕获水域水质、清洗用水的质量和其它因素。从腐败的牡蛎中已分离得到的菌有：赛氏杆菌、假单胞菌、变形杆菌、梭状芽孢杆菌、芽孢杆菌、埃希氏大肠杆菌、肠细菌、*Shewanella*、乳酸菌、黄杆菌和小球菌。在腐败开始及中间过程中，以假单胞菌和不动杆菌-摩氏杆菌属菌为主导菌，而肠球菌、乳酸菌和酵母菌为腐败后期的主导菌。

由于含相对较多的糖原，软体动物的腐败变质基本上是发酵作用，包括 Hunter、Linden[35] 和 Pottinger[29] 在内的一些研究者提出将 pH 作为牡蛎微生物卫生质量标准的设想，并认为 pH 与牡蛎质量符合下列关系：

pH6.2～5.9	好
pH5.8	变质
pH5.7～5.5	发霉
pH<5.2	酸败或腐败

显然，用测 pH 下降的方法对牡蛎和其它软体动物进行腐败检测，比测挥发性盐基氮方法更为有利。Beacham[6]试图用测挥发性酸来测定牡蛎的鲜度，但结果并不理想。虽然，大多数学者认为测 pH 是一种最好的检验牡蛎微生物卫生质量的方法，但 Abbey 等人[1]却认为在这类产品中，感观评定和微生物菌数才是评定其微生物卫生质量的可靠指标。

蛤和扇贝的腐败方式与牡蛎似乎基本一致，但鱿鱼腐败方式与它们有区别。鱿鱼发生腐败时，挥发性盐基氮增加，这与甲壳纲贝类水产腐败更为相似。

参 考 文 献

[1] Abbey, A., R. A. Kohler, and S. D. Upham. 1957. Effect of aureomycin chlortetracycline in the processing and storage of freshly shucked oysters. *Food Technol.* 11: 265～271.

[2] Abeyta, C., Jr. 1983. Comparison of iron milk and official AOAC methods for enumeration of *Clostridium perfringens* from fresh seafoods. *J. Assoc. Offic. Anal. Chem.* 66: 1175～1177.

[3] Ahmed, A., and J. R. Matches. 1983. Alcohol production by fish spoilage bacteria. *J. Food Protect.* 46: 1055～1059.

[4] Andrews, W. H., C. R. Wilson, P. L. Poelma, and A. Romero. 1977. Bacteriological survey of the channel catfish (*Ictalurus punctalus*) at the retail level. *J. Food Sci.* 42: 359～363.

[5] Barnes, E. M., and C. S. Impey. 1968. Psychrophilic spoilage bacteria of poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 97～107.

[6] Beacham, L. M. 1946. A study of decomposition in canned oysters and clams. *J. Assoc. Offic. Agric. Chem.* 29: 89～92.

[7] Chen, T. C., and R. E. Levin. 1974. Taxonomic significance of phenethyl alcohol production by *Achromobacter* isolates from fishery sources. *Appl. Microbiol.* 28: 681～687.

[8] Chen, T. C., W. W. Nawar, and R. E. Levin. 1974. Identification of major high-boiling volatile compounds produced during refrigerated storage of haddock fillets. *Appl. Microbiol.* 28: 679～680.

[9] Cobb, B. F., III, and C. Vanderzant. 1985. Development of a chemical test for shrimp quality. *J. Food Sci.* 40: 121～124.

[10] Fields, M. L., B. S. Richmond, and R. E. Baldwin. 1968. Food quality as determined by metabolic by-products of microorganisms. *Adv. Food Res.* 16: 161～229.

[11] Foster, J. F., J. L. Fowler, and J. Dacey. 1977. A microbial survey of various fresh and frozen seafood products. *J. Food Protect.* 40: 300～303.

[12] Fraiser, M. B., and J. A. Koburger. 1984. Incidence of salmonellae in clams, oysters, crabs and mullet. *J. Food Protect.* 47: 343～345.

[13] Herbert, R. A., M. S. Hendrie, D. M. Gibson, and J. M. Shewan. 1971. Bacteria active in the spoilage of certain sea foods. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 41～50.

[14] Hobbs, G. 1983. Microbial spoilage of fish. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*, ed.

T. A. Roberts and F. A. Skinner, 217～229. London: Academic Press.

[15] Hunter, A. C., and B. A. Linden. 1923. An investigation of oyster spoilage. *Amer. Food J.* 18: 538～540.

[16] Ingram, M., and R. H. Dainty. 1971. Changes caused by microbes in spoilage of meats. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 21～39.

[17] Jacquot, R. 1961. Organic constituents of fish and other aquatic animal foods. In *Fish as Food*, ed. G. Borgstrom, vol. 1, 145～209. New York: Academic Press.

[18] Johnson, A. R., and D. M. Ogrydziak. 1984. Genetic adaptation to elevated carbon dioxide atmospheres by *Pseudomonas*-like bacteria isolated from rock cod (*Sebastes* spp.). *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 486～490.

[19] Kazanas, N., J. A. Emerson, H. L. Seagram, and L. L. Kempe. 1966. Effect of γ-irradiation on the microflora of fresh-water fish. I. Microbial load, lag period, and rate of growth on yellow perch (*Perca flavescens*) fillets. *Appl. Microbiol.* 14: 261～266.

[20] Krzymien, M. E., and L. Elias. 1990. Feasibility study on the determination of fish freshness by trimethylamine headspace analysis. *J. Food Sci.* 55: 1228～1232.

[21] Lee, J. S., and J. M. Harrison. 1968. Microbial flora of Pacific hake (*Merluccius productus*). *Appl. Microbiol.* 16: 1937～1938.

[22] Lee, J. S., and D. K. Pfeifer. 1977. Microbiological characteristics of Pacific shrimp (*Pandalus jordani*). *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 853～859.

[23] Leininger, H. V., L. R. Shelton, and K. H. Lewis. 1971. Microbiology of frozen cream-type pies, frozen cooked-peeled shrimp, and dry food grade gelatin. *Food Technol.* 25: 224～229.

[24] Leisner, J. J., J. C. Millan, H. H. Huss, and L. M. Larsen. 1994. Production of histamine and tyramine by lactic acid bacteria isolated from vacuum-packaged sugar-salted fish. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 417～423.

[25] Lerke, P., R. Adams, and L. Farber. 1965. Bacteriology of spoilage of fish muscle. III. Characteristics of spoilers. *Appl. Microbiol.* 13: 625～630.

[26] Matches, J. R. 1982. Effects of temperature on the decomposition of Pacific coast shrimp (*Pandalus jordani*). *J. Food Sci.* 47: 1044～1047, 1069.

[27] Molin, G., and I. -M. Stenstrom. 1984. Effect of temperature on the microbial flora of herring fillets stored in air or carbon dioxide. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 275～282.

[28] Nickerson, J. T. R., and S. A. Goldblith. 1964. A study of the microbiological quality of haddock fillets and shucked, soft-shelled clams processed and marketed in the greater Boston area. *J. Milk Food Technol.* 27: 7～12.

[29] Pottinger, S. R. 1948. Some data on pH and the freshness of shucked eastern oysters. *Comm. Fisheries Rev.* 10 (9): 1～3.

[30] Saisithi, P., B. -O. Kasemsarn, J. Liston, and A. M. Dollar. 1966. Microbiology and chemistry of fermented fish. *J. Food Sci.* 31: 105～110.

[31] Shaw, B. G., and J. M. Shewan. 1968. Psychrophilic spoilage bacteria of fish. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 89～96.

[32] Shelef, L. A., and J. M. Jay. 1971. Hydration capacity as an index of shrimp microbial quality. *J. Food Sci.* 36: 994～997.

[33] Shewan, J. M. 1961. The microbiology of sea-water fish. In *Fish as Food*, ed. G. Borgstrom,

vol. 1, 487～560. New York: Academic Press.

[34] Silverman, G. J., J. T. R. Nickerson, D. W. Duncan, N. S. Davis, J. S. Schachter, and M. M. Joselow. 1961. Microbial analysis of frozen raw and cooked shrimp. I. General results. *Food Technol.* 15: 455～458.

[35] Stenstrom, I. -M., and G. Molin. 1990. Classification of the spoilage flora of fish, with special reference to *Shewanella putrefaciens*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 601～618.

[36] Sullivan, J. D., Jr., P. C. Ellis, R. G. Lee, W. S. Combs, Jr., and S. W. Watson. 1983. Comparison of the *Limulus amoebocyte* lysate test with plate counts and chemical analyses for assessment of the quality of lean fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 720～722.

[37] Sundhagul, M., W. Daengsubha, and P. Suyanandana. 1975. Thailand's traditional fermented food products: A brief description. *Thai J. Agr. Sci.* 8: 205～219.

[38] Swartzentruber, A., A. H. Schwab, A. P. Duran, B. A. Wentz, and R. B. Read. Jr. 1980. Microbiological quality of frozen shrimp and lobster tail in the retail market. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 765～769.

[39] Tarr, H. L. A. 1954. Microbiological deterioration of fish post mortem, its detection and control. *Bact. Rev.* 18: 1～15.

[40] Timoney, J. F., and A. Abston. 1984. Accumulation and elimination of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium* by hard clams in an in vitro system. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 986～988.

[41] Vanderzant, C., A. W. Matthys, and B. F. Cobb, III. 1973. Microbiological, chemical, and organoleptic characteristics of frozen breaded raw shrimp. *J. Milk Food Technol.* 36: 253～261.

[42] Van Veen, A. G., and K. H. Steinkraus. 1970. Nutritive value and wholesomeness of fermented foods. *J. Agr. Food Chem.* 18: 576～578.

[43] Velankar, N. K., and T. K. Govindan. 1958. A preliminary study of the distribution of nonprotein nitrogen in some marine fishes and invertebrates. *Proc. Indian Acad. Sci.* B47: 202～209.

[44] Watt, B. K., and A. L. Merrill. 1950. Composition of foods raw, processed prepared. *Agricultural Handbook No.* 8. Washington, DC: USDA.

[45] Wentz, B. A., A. P. Duran, A. Swartzentruber, A. H. Schwab, and R. B. Read. Jr. 1983. Microbiological quality of fresh blue crabmeat, clams and oysters. *J. Food Protect*, 46: 978～981.

7. 发酵作用与发酵乳制品

虽然本部分的主要内容是乳与乳制品，但是由于发酵在乳制品生产中的重要性，本部分的论述从发酵开始。

7.1 发酵作用

7.1.1 背景

许多食品的制作和特性与微生物的发酵活力有关。许多诸如成熟奶酪、腌菜、泡菜和发酵香肠等发酵保藏食品，它们的货架期远高于用于制作成品的原料。除了增加产品的货架期外，所有发酵制品都有特征性的芳香风味，这些风味直接或间接地来自于发酵菌群。在某些情况下，发酵食品的维生素含量增加，并使原料的可消化吸收性提高。一方面，发酵可以降低一些食物的毒性（例如在 gari 和 peujeum 中），而另一方面有些食物经过发酵可能会变得剧毒（例如在 bongkrek 中）。种种事实表明，发酵食品的重要性以及它的良好营养作用是世界上任何一种食物或食品无法比拟的。

关于奶酪、泡菜及酒等食品的微生物生态学及相关的发酵作用已研究多年，有关内部和外部的生长参数对发酵微生物发酵活力的影响已在第二部分 2 中进行了讨论。例如，对天然原料进行酸化，并使其含有丰盛的糖源时，酵母生长迅速，而它们产生的酒精又会限制大多数自然存在于原料中的其它微生物的生长活性。另一方面，如果一种植物产品的酸性条件可以使有益菌生长，同时它又含有较高浓度的单糖，乳酸菌就可能生长，且在添加少量食盐的情况下，将保证乳酸菌的生长优于酵母（在泡菜的发酵中就是如此）。

由于酵母和乳酸菌缺乏分泌淀粉酶的能力，因此酵母和乳酸菌一般不能在含多糖，而单糖含量又不高的产品中生长。为达到发酵目的，必须补充外源糖化酶。在酿造和蒸馏酒生产中使用大麦麦芽就是基于这一原理。糖发酵形成乙醇也是经麦芽糖生产及酵母发酵两个步骤完成的。大豆发酵中使用日本酒曲（koji）就是这样的一个例子，在这种低水平糖源及高淀粉和蛋白质含量的大豆原料中，koji 的加入使乙醇和乳酸发酵得以顺利进行。日本酒曲是米曲霉在浸泡过的或蒸熟的大米或其它谷物上生长制成的，而大麦麦芽糖化酶分泌于发芽的大麦中。与酱油制作原理一样，日本酒曲的水解物可被乳酸菌和酵母利用进行发酵，日本酒曲酶可应用于诸如日本豆酱产品的生产，也可直接作用于大豆。

7.1.2 定义和特点

发酵这个词在过去有许多不同的意思，根据一本字典的定义，它是“一种伴有泡沫产生的化学变化过程……搅动和不安的一种状态……有机物的各种转化”。在巴斯德对酒进行研究之前，发酵这个词就已经使用。Prescott、Dunn[40]和 Doelle[11]对发酵这个词的

沿革进行了研究。前两位作者指出，从广义上讲，普遍使用的“发酵”这一术语的含义是：它是“微生物分泌的酶作用于有机底物而产生化学变化的过程”。由于这一定义使用的广泛性，本部分也采用这一术语。在酿造工业中，上层发酵是指利用能在大发酵缸上面生长、发挥其生理活性的酵母菌株进行的发酵过程，例如英国黄啤的生产。而下层发酵则利用能在发酵缸底部发挥生理活性的酵母菌株，例如德国淡啤的生产。

从生物化学角度讲，发酵作用是指在无任何外界电子接受体的情况下，碳水化合物及相关化合物部分氧化，并伴随能量释放的一个代谢过程。发酵过程中最终电子受体是碳水化合物降解后产生的有机物。因此，发酵中代谢物进行的是不完全氧化作用过程，在这个过程中只有少量能量的释放。发酵作用的产物是由一些比其它物质还原更彻底的有机物组成。

7.1.3 乳酸菌

时至今日，这类菌共有 11 属革兰氏阳性菌 G（+）菌构成：

肉食杆菌属（*Carnobacterium*）　　片球菌属
肠球菌属　　酒球菌属
乳球菌属　　链球菌属
乳杆菌属　　漫游球菌属
乳球形菌属　　魏斯氏菌属
明串珠菌属

由于肠球菌和乳球菌（*Lactococci*）已从链球菌属中分出，因此在这个属中，对食品生产有重要意义的菌是嗜热链球菌。对丁二酮乳链球菌已作了重新分类，将其归为利用柠檬酸盐的乳酸乳球菌亚种（*Lactococcus Lactis*）。与乳酸菌有关的，但没有考虑将其列入乳酸菌群的有气球菌属、小杆菌属和丙酸杆菌等。后一属中的一部分菌已被列入 *Propionif erax* 属中。这属菌的特点是分解葡萄糖后以丙酸作为其主要的羧酸。

Sandine 等学者阐述了关于乳酸链球菌的历史沿革及其生态学方面的知识[45]，他们认为植物是这些菌群的天然寄居地，但是缺乏奶油色乳球菌（*Lactococcus cremoris*）起源子植物的证据，因此植物链球菌可能是这类菌的原种，其他乳酸菌种则从其发展而来。

虽然乳酸菌群没有严格的定义，但它们的共性是能将己糖转化成乳酸。作为发酵菌，由于缺乏功能性的与血红素相连的电子转运系统或细胞色素体系，在发酵利用碳水化合物时，它们只能依靠底物水平磷酸化获得能量，而不具有进行三羧酸循环的功能。

根据葡萄糖代谢的终产物的不同，Kluyver 将乳酸菌分成两类。其中同型发酵菌以乳酸作为主要或惟一的发酵产物（图 7.1A）。在葡萄糖量一定时，同型发酵菌发酵产生的能量大约是异型发酵菌的两倍。有的同型发酵菌在对葡萄糖代谢时进行的是同型发酵，但在发酵利用戊糖时却未必如此，因为此时它们可代谢产生乙酸和乳酸。此外，当微生物生长条件，如葡萄糖浓度、pH 和营养限制改变时，一些菌株的同型发酵特点也会发生变化。

异型乳酸发酵乳酸菌是指能利用己糖产生等摩尔乳酸、CO_2 和乙醇的一类乳酸菌（图 7.1B）。片球菌属、链球菌属、乳球菌属和漫游球菌属中的所有成员，以及一些乳酸杆菌是同型发酵菌。异型发酵菌包括明串珠菌、酒球菌、魏斯氏菌、肉食杆菌属及一些乳酸

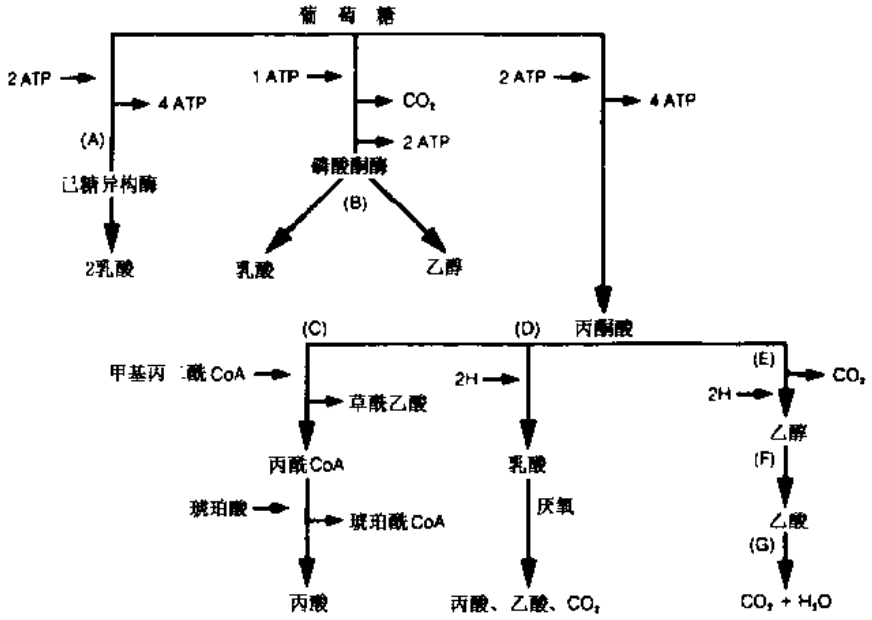


图 7.1 各种菌种利用葡萄糖发酵的一般途径

(A) 同型发酵乳酸菌 (B) 异型发酵乳酸菌 (C)、(D) 丙酸杆菌（见图 7.3）

(E) 酵母菌 (F) 醋酸杆菌属菌 (G) 醋酸杆菌"过氧化"

杆菌属中的菌（表 7.1）。在风味成分，例如丁二酮和乙醛产生方面，异型发酵型比同型发酵型发挥的作用更大（图 7.2）。

表 7.1 同型和异型发酵乳酸菌

同型发酵			异型发酵		
菌种	乳酸结构	G+C/(%)	菌种	乳酸结构	G+C/(%)
乳酸杆菌			乳酸杆菌		
嗜酸乳杆菌	DL	36.7	短乳杆菌	DL	42.7～46.4
保加利亚乳杆菌	D (－)	50.3	布氏乳杆菌	DL	44.8
干酪乳杆菌	L (＋)	46.4	纤维二糖乳杆菌	DL	53
棒状乳杆菌	DL	45	嗜粪乳杆菌	DL	41.0
弯曲乳杆菌	DL	43.9	发酵乳杆菌	DL	53.4
德氏乳杆菌	D ()	50.0	海格乳杆菌	DL	40.3
詹氏乳杆菌	DL	39.3	旧金山乳杆菌	DL	38.1～39.7
L. jugurti	DL	36.5～39.0	*L. trichoides*	DL	42.7
瘤胃乳杆菌	D ()	36.1	食果糖乳杆菌	DL	38～41
乳酸乳杆菌	D (－)	50.3	桥乳杆菌	DL	53～56
莱希曼乳酸杆菌	D ()	50.8	明串珠菌属		
植物乳杆菌	DL	45	蚀橙明串珠菌	D (－)	39～42
唾液乳杆菌	L (＋)	34.7	戊糖明串珠菌	D (－)	38～39
片球菌属			乳酸明串珠菌	D (－)	43～44
乳酸片球菌	DL	44.0	肠膜状明串珠菌	D (－)	39～42
啤酒片球菌	DL		冷明串珠菌	D ()	37
戊糖片球菌	DL	38.0	肉明串珠菌	D (－)	39

续表

同型发酵			异型发酵		
菌种	乳酸结构	G+C/(%)	菌种	乳酸结构	G+C/(%)
链球菌属			肉食杆菌属		
牛链球菌	D (−)	38～42	歧异肉食杆菌		33.0～36.4
嗜热链球菌	D (·)	40.0	游动肉食杆菌		35.5～37.2
乳链球菌属			鸡肉食杆菌		34.3～36.4
乳酸乳球菌乳酸亚种	D (−)	38.4～38.6	鱼肉食杆菌		33.7～36.6
乳酸乳球菌奶油色亚种	D (·)	38.0～40.0	魏斯氏菌属		
乳酸乳球菌叶蝉亚种		35.2	混淆魏斯氏菌	DL	44.5～45.0
棉籽糖乳球菌		40.0～43.0	希腊魏斯氏菌	D (−)	37～47
植物乳球菌		36.9～38.1	耐盐魏斯氏菌	DL	45
格氏乳球菌		38.3～38.7	坎氏魏斯氏菌	DL	39
漫游球菌属			微小魏斯氏菌	DL	40
河漫游球菌		33.6	类肠膜魏斯氏菌	D (−)	38～39
鲑鱼漫游球菌		36.0～36.5	绿色魏斯氏菌	DL	43
			酒球菌属		
			酒类酒球菌	DL	38～42

乳酸杆菌属已被进一步细分为 3 个亚属：*β*-菌（*Betabacterium*）、链杆菌（*Streptobacterium*）、嗜热杆菌（*Thermobacterium*）。表 7.1 中将所有异型乳酸菌归于 *Betabacterium* 亚属之中。*Streptobacterium* 亚属中的菌（例如干酪乳杆菌和植物乳杆菌）在 30℃的最适温度下，乳酸的产量可以达到 1.5%，而嗜热杆菌（如嗜酸乳酸菌和保加利亚乳酸菌）在 40℃的最适温度下，乳酸产量可以达到 3%[35]。

从生长要求来看，游离的氨基酸、B 族维生素、嘌呤碱和嘧啶碱是乳酸菌生长所必需的。因此，这些化合物可以用于微生物分析试验。虽然乳酸菌是嗜中温的，但有些也能在 5℃以下或 45℃时生长。至于 pH，大多数乳酸菌生长范围在 4.0～4.5 之间，有些能在 pH 为 3.2 时生长，有些能在 pH 为 9.6 时生长。另外乳酸菌只有微弱的水解蛋白质和脂肪的能力[32]。

Schleifer 和 Kandler 曾对乳酸菌及其他细菌的细胞黏肽进行过研究[46]。虽然大多数乳酸菌属菌的细胞黏肽差别很大，但 *Thermobacterium* 亚属中的同型乳酸发酵菌似乎具

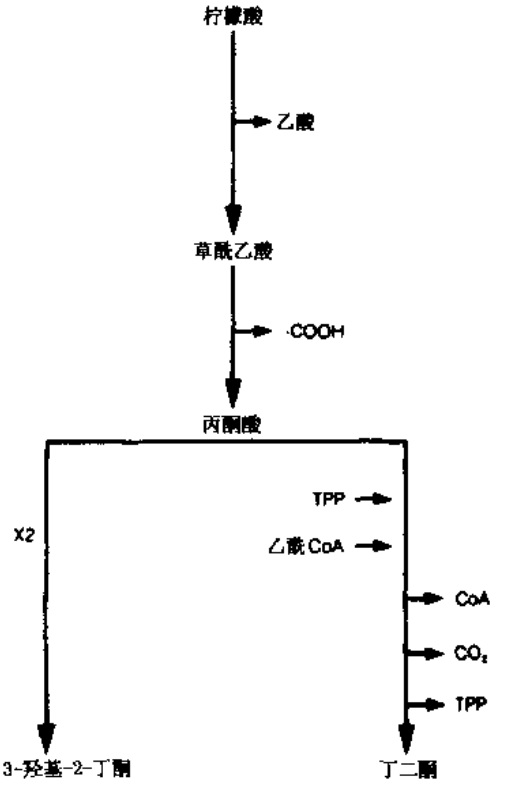


图 7.2 乳酸菌和明串珠菌利用柠檬酸生成 3-羟基-2-丁酮和丁二酮的一般途径

注：丙酮酸可能由乳酸而来，乙酰 CoA 来自乙酸[7,50,51]。

有最大的相似性：肽聚糖肽链含有L-赖氨酸，肽链间桥含有D-色氨酸。链球菌属也有相似的细胞黏肽壁。

为稳定乳酸链球菌的乳酸发酵作用，Mckay及其同事对其分子遗传技术进行了研究，认为某些乳球菌的乳糖发酵作用与质粒基因有关，缺乏质粒就无法进行乳糖发酵。为了使乳糖发酵更加稳定，来自乳酸链球菌的Lac^-基因被克隆到载体，然后将载体转入到血链球菌菌株中[24]。这样，来自乳酸菌的Lac^+基因通过质粒载体进入血链球菌株中，或者通过合适的DNA片段将Lac^+基因整合到宿主细胞的染色体中[25]。后一种方法得到的乳酸发酵特性比前一种方法更加稳定。

7.1.4 代谢途径和摩尔生长量

在利用葡萄糖时，同型发酵菌和异型发酵菌得到不同的终产物，这是由于它们基本的遗传和生理特性不同所造成的（图7.1）。同型发酵菌具有醛缩酶和己糖异构酶，但没有磷酸酮酶（图7.1A）。它们通过糖酵解（EMP）途径将1分子葡萄糖分解成2分子乳酸；而异型发酵菌恰恰相反，它们具有磷酸酮酶而没有醛缩酶和己糖异构酶，是通过磷酸己糖或戊糖途径来降解葡萄糖的（图7.1B）。

摩尔生长量的测定可以提供有关发酵菌的发酵底物和途径的信息。假设底物中的碳不用于细胞合成，氧不作为电子或氢的受体，来自底物代谢的全部能量都与细胞合成相偶联[22]、每发酵1μmol底物所产生的细胞干重的微克数定为摩尔生长量常数（molar yield constant），用Y表示。例如，当以葡萄糖作为底物时，摩尔生长量常数用Y_G表示：

$$Y_G = \frac{\text{细胞干重(g)}}{\text{发酵的葡萄糖物质的量(mol)}}$$

当底物一定，利用每摩尔底物产生的ATP量或已知ATP物质的量时，每生成1mol ATP所产生的细胞干重可以用Y_{ATP}表示：

$$Y_{ATP} = \frac{\text{细胞干重(g)/生成的ATP物质的量(mol)}}{\text{发酵底物的物质的量(mol)}}$$

在细胞生长过程中测得的大量发酵微生物的$Y_{ATP} \approx 10.5$。假设此值是恒定的，那么通过EMP途径，生物体每利用1mol葡萄糖就能产生2mol ATP，$Y_G = 21$（即每发酵1mol葡萄糖能生成21g干细胞）。这已在粪肠球菌、啤酒酵母、罗氏酵母和植物乳杆菌利用葡萄糖时得到证实（在实验允许的误差范围内，所有菌的$Y_G = 21$，$Y_{ATP} = 10.5$）。Brown和Collins研究指出，在葡萄糖水平较低和较高的限制性培养基中，丁二酮乳球菌（*L. diacetilactis*）和奶油色乳球菌（*L. cremoris*）有氧生长时Y_G和Y_{ATP}值都会发生变化，当它们生长在复杂培养基中时变化更大。在低葡萄糖水平（1～7μmol/mL）的部分限制培养基中，丁二酮乳球菌的$Y_G = 35.3$，$Y_{ATP} = 15.6$，而奶油色乳球菌的$Y_G = 31.4$，$Y_{ATP} = 13.9$；在同样的培养基中，将葡萄糖水平提高（1～15μmol/mL），丁二酮乳球菌的$Y_G = 21$，在2μmol葡萄糖/mL的复杂培养基中丁二酮乳球菌和奶油色乳球菌的Y_{ATP}分别为21.5和18.9。Johnson和Collins对链球菌菌株在低葡萄糖水平下厌氧生长时的摩尔生长量进行了研究[23]。运动发酵单胞菌利用恩-杜氏糖解途径发酵1mol葡萄糖只产生1mol ATP（$Y_G = 8.3$，$Y_{ATP} = 8.3$），假如生成的乳酸继续代谢，摩尔生长量将进一步提高；而

双歧杆菌发酵 1mol 葡萄糖产生 2.5～3mol ATP（$Y_G=Y_{ATP}=13$）[53]。

此外摩尔生长量除了用于在产生相同能量的底物的条件下对菌体进行比较外，这个概念也可用于确定各种微生物对不同碳水化合物分解利用的代谢途径。

7.2 乳制品

7.2.1 乳中微生物的菌相

在牛的乳房、皮肤、盛乳器具和生产线上的微生物都可以出现在原料乳中。经过适当的处理并贮藏于合适条件下的原料乳其微生物主要以革兰氏阳性菌为主。原料乳在冰箱中放置几天后，总是会出现以下几种甚至全部细菌，这些菌为肠球菌、乳球菌、链球菌、明串珠菌、乳酸杆菌、微乳杆菌、厄氏菌属（*Oerskovia*）、丙酸菌、微球菌、变形杆菌、假单胞菌、芽孢杆菌、李斯特菌、以及至少一种肠杆菌属中的菌。关于原料乳中李斯特菌的问题将在第七部分 22 中进一步讨论。一般在低温处理条件下不能生长的菌在原料乳中的数量也较少。在原料乳中已分离得到过适冷芽孢菌和分枝杆菌。如在一项研究中，在 97 个被测的原料乳样品中适冷芽孢菌出现的比例是 25%～36%[48]，它们能在 7℃或 7℃以下条件下生长；在另一项研究中，从 4 或 48 个原料乳样品中分离得到了适冷性的梭状芽孢杆菌[5]。另一项研究称：51 批原料乳样品中 69%出现了分枝杆菌和诺卡氏菌属[28]。巴氏灭菌过程可以杀灭除了耐热菌以外的所有细菌，这些耐热菌主要是链球菌和乳酸菌以及可能存在的芽孢和梭状芽孢杆菌。

牛乳是一些疾病的传播媒介。因食用牛乳暴发的疾病通常与生饮牛乳有关，这也包括生饮经检疫的牛乳。家庭制作的冰淇淋，含有鲜蛋、奶粉以及可能遭受污染的巴氏消毒乳，常与食品传染病的暴发有关。由弯曲杆菌和沙门氏菌引起的疾病也可能来自于牛乳及牛乳制品；李斯特菌疾病和出血性肠炎也与牛乳有关。

巴氏消毒奶腐败的主要原因是耐热乳球菌生长，它们利用乳糖产生乳酸，使 pH 降至 4.5 左右，从而使牛奶凝结变质。乳杆菌（若存在的话）能在低于乳球菌所要求的 pH 下生长。这些微生物的继续发酵可能会使 pH 降到 4.0 或 4.0 以下。另外假如存在有霉菌孢子，则有可能会在酸奶表面萌发生长，并使 pH 中性化，促进更多的像假单胞菌这样能水解蛋白质的细菌生长，结果使凝结的牛乳液化。

在冷藏条件下，原料乳的腐败模式基本同上，通常所见的原料乳的发黏现象是由黏乳产碱杆菌引起的，它适合于在低温下贮存了数天的原料乳中生长。黏稠物由细菌细胞产生的黏液层物质组成，这些物质的产生使产品的黏度增加。

7.2.2 发酵剂、产品

本部分讨论的产品，其生产过程中都需要使用一种适合的发酵剂。乳酸发酵剂（Lactic starter）是在乳品工业中广泛使用的一种基础发酵剂。在各种类型的干酪生产中，产生乳酸是制作的基本条件，采用乳酸发酵剂的目的即在于此。乳酸发酵剂也使用于奶油、酸酪乳、农家干酪、酸稀奶油生产，并且按其使用的产品对象命名（例如奶油发酵剂、酪

乳发酵剂等)。乳酸发酵剂总是由能将乳糖转化为乳酸的细菌构成，通常是乳酸乳球菌(*L. Lactis*)，蚀橙明串珠菌或丁二酮乳球菌。如果产品中需要产生丁二酮等风味和芳香物质，乳酸发酵剂中应包含诸如噬柠檬酸明串珠菌、丁二酮乳链球菌或戊糖明串珠菌等菌种(生物合成途径可见图 7.2 和参考文献[7])。发酵剂既可由单株菌种组成，也可由多株菌组成。发酵剂可以成批生产，在液氮中保存或通过冷冻干燥保存[16]。在混合发酵剂中，乳球菌一般占 90%左右的比例，一种良好的发酵剂能将大多数乳糖转化为乳酸。使用后，产品的滴定酸度可达 0.8%～1.0% (乳酸计)，pH 一般可降至 4.3～4.5[12]。

奶油、酪乳和酸奶油生产的一般过程是：在经巴氏杀菌的稀奶油或乳中接种乳酸发酵剂，并经发酵达到所要求的酸度。在奶油生产中，在稀奶油中接种发酵剂，培养形成酸性稀奶油，再经搅乳机形成奶油，奶油再经洗涤、加盐、包装制成产品[39]。酪乳，顾名思义，是稀奶油生产奶油后剩下的一部分乳。其工业化产品的生产是在脱脂乳中接种乳酸或酪乳发酵剂，并经培养直至产生一定的酸度，形成的凝块通过搅拌形成细小颗粒，这种产品称为酸酪乳。酸性奶油生产中通常将乳酸发酵剂接种于经巴氏杀菌和均质的低脂稀奶油中，并经发酵制成产品。产品中的乳酸是酸味的来源，而产品中的丁二酮则是其奶油芳香味的来源。

酸乳是用酸乳发酵剂制成的，常用的酸乳发酵剂是由嗜热链球菌和保加利亚乳杆菌以 1∶1 构成。球菌的生长速度比杆菌快，并且是主要的产酸菌。而杆菌的作用是增加产品的风味和芳香。这两种菌共同生长时产酸的速度比各个菌单独生长时的要快，而且保加利亚乳杆菌在与嗜热链球菌共同生长时，可以产生更多的乙醛，后者是酸乳的主要挥发性风味成分[41]。

酸乳生产中的第一步骤是浓缩，将全脂或脱脂乳的水分含量减少至少 1/4。浓缩过程可以在杀菌后于真空浓缩器中完成，并可加入约 5%的乳粉或炼乳。乳浓缩后加热至82～93℃，并保持 30～60min，冷却至约 45℃[39]。按乳体积的 2%左右的比例接种酸乳发酵剂，并在 45℃培养温度下保温 3～5h，然后冷却至 5℃。良好产品的最终滴定酸度大约为 0.85%～0.90%，为达到这样的酸度，当产品酸度达 0.65%～0.70%时应停止其在 45℃下的前期发酵过程[8]。品质良好的酸乳在 5℃下可保存 1～2 星期。在发酵过程中球菌首先生长，然后是杆菌的生长。因此，大约 3h 以后，这两种菌的数量将大致相等。通过延长发酵时间可得到高酸度产品(例如 4%)，此时杆菌的数量将超过球菌。在pH4.2～4.4 间，链球菌会受到抑制，而乳杆菌在 pH3.5～3.8 时，还可能生长。酸乳中的乳酸更多产生于乳糖分解产生的葡萄糖，而不是半乳糖。Goodenough 和 kleyn[20]在发酵后的酸乳中只检测出微量的葡萄糖，而半乳糖含量却从最初时的微量升至 1.2%左右。商品酸乳样品中也只有微量的葡萄糖，而半乳糖含量在 1.5%～2.5%左右。

刚生产出的酸乳通常含 10^9 个/g 活菌，经贮存后，菌数可降至 10^6 个/g，当产品贮存于 5℃下，长达 60d 时，情况更是如此[23]。一般杆菌数量降低的速度要比球菌的大，酸乳中添加水果似乎的确不会影响发酵微生物的数量[23]。

Goel 等人[17]对酸乳、酪乳、酸奶油和农家干酪的抗菌特性进行了试验[23]，试验中将产气肠杆菌和埃希氏大肠杆菌分别接种于这些产品中，在贮存温度为 7.2℃时，测定这些菌的致死率情况。24h 后，在酸乳和酪乳中，这两种肠杆菌的数量有明显的下降。3d 后，

在酸乳中已无法检测出该类细菌。虽然在酸奶油中肠杆菌的数量也会下降，但其下降速度没有在酸乳中的那么快。在一些乡村干酪中，肠杆菌的数量反而有所上升，究其原因可能是该类产品具较高的 pH。研究采用产品的最初 pH 分别是：酸乳 3.65～4.40，酪乳 4.1～4.9、酸奶油 4.18～4.70、乡村干酪 4.80～5.10。在另一项研究中，152 个产自美国亚特兰大市的酸乳中只有 15%的杆菌和球菌的比例接近所要求的 1∶1[4]。这些酸乳中，葡萄球菌的检出率为 27.6%，大肠杆菌检出率约 14%。这些样品中 26%的酵母菌数大于 1000 个/g，几乎 12%的样品其嗜冷菌的数量超过 1000 个/g。Davis[8]在对产于大不列颠非风味酸乳进行试验时发现，产品中保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌的总数最低约为 8.2×10^{7} 个/g，最高达 1×10^{10}个/g，pH 3.75～4.20。有关乳酸细菌的抗菌活性的进一步讨论将在第二部分 3 中进行。

克菲尔酸牛乳酒（Kefir）是利用克菲尔酒糟进行制作的，该酒糟中含有与凝结蛋白质混于一体的乳酸乳球菌、保加利亚乳杆菌和发酵乳糖的酵母菌，其中的细菌起产酸作用，酵母则产生酒精。乳酸和酒精的最终浓度可达 1%。乳酒（Kumiss）除了采用的原料是马乳，菌种不是以酒糟形式出现，酒精含量可达 2%以外，其它与克菲尔酸牛乳酒相似。

嗜酸菌酸乳是将可以在人肠道中定植的嗜酸乳杆菌接种于杀菌的脱脂乳中进行发酵制成的。其接种量为 1%～2%，培养温度为 37℃，以产生光滑的凝固状为发酵结束的标志。保加利亚酪乳是以保加利亚乳杆菌为发酵剂，按相似的方式制作而成。与嗜酸菌不同，保加利亚乳杆菌不能在人体内进行定植，表 7.2 中归纳了有关发酵乳的概况。

表 7.2　　发酵乳产品

食品和产品	原料	发　酵　菌	产　地
嗜酸菌酸乳	牛乳	嗜酸乳杆菌	许多国家
保加利亚酪乳	牛乳	保加利亚乳杆菌	巴尔干等地区
干酪（成熟）	凝乳	乳酸发酵剂、其它	全世界
克尔菲酸乳酒（Kefir）	牛乳	乳酸乳球菌、保加利亚乳杆菌、圆酵母菌	亚洲西南部
马奶酸乳酒（Kumiss）	生马乳	保加利亚乳杆菌、圆酵母菌、莱希曼氏乳杆菌	俄罗斯
黏性发酵乳（Taette）	牛乳	乳酸链球菌 *taette* 变种	斯堪的纳维亚半岛
Tarhana[a]	小麦粉和酸乳	乳酸菌	土耳其
酸乳[b]	牛乳、乳粉	嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌	全世界

[a] 类似于叙利亚的 Kishk 和伊朗的 Kushuk。

[b] 酸乳在亚美尼亚称为 matzoon，埃及称 Leben，保加利亚称 naja，意大利称 gioddu，印度称 dadhi。

奶油中含大约 15%的水分，81%的脂肪以及一般低于 0.5%的碳水化合物和蛋白质。虽然它不是一种易腐败的产品，但细菌和霉菌也可导致其腐败。不管稀奶油是甜还是酸，也不管它是否经过巴氏杀菌，对奶油而言，其微生物的主要来源是稀奶油。因为在脂肪上浮至牛乳表面时，不可避免地携带着全脂乳中的菌。所以全脂乳中存在的菌群，在稀奶油中都可测出。生的和巴氏杀菌过的稀奶油在生产黄油过程中其菌数量都会有所下降，对加盐奶油产品其最终产品的含菌量在每克几百至十万个之间。

在奶油中，由细菌引起的腐败主要有两种类型。第一种被称为表面腐败或腐烂，这

种现象的发生是由腐败假单胞菌在奶油表面所引起的。它可以在 4～7℃温度范围中生长，经 7～10d 可以呈现出来，这种变质产生的异味很明显来自于一些有机酸，尤其是异戊酸。第二种常见的腐败现象称为酸败，它是由奶油中存在的游离脂肪酸水解造成的。除微生物产生的脂酶外，其它来源的脂酶也有些作用。产生脂酶的菌主要是耶格氏假单胞菌，有时荧光假单胞菌也有发现。在奶油中细菌也可产生其它二种不常见的腐败情况：由于乳酸乳球菌（*Maltigenes*）变种而产生的麦芽味；由臭味假单胞菌（*P. mephitica*）造成的类似臭鼬味；由致黑假单胞菌造成的黑变。

由芽枝霉、交链孢霉、曲霉、毛霉、根霉、青霉和地霉属的真菌，尤其是白地霉造成的奶油真菌腐败相当普遍。这些霉菌在奶油表面形成可见的菌落，它们的孢子所具有的各种颜色使奶油染上不同的色泽。据报道，圆酵母属中的黑酵母也可使奶油发生色泽改变。对发霉的奶油进行显微镜观察，可以看到霉菌菌丝体的存在。一般来讲，高脂、低水分含量的奶油由霉菌引起腐败的可能性要高于由细菌引起的腐败。

细菌、酵母、霉菌都可使乡村干酪发生腐败。由细菌引起的最常见的腐败现象称黏性凝乳（slimy curd）。尽管假单胞菌、变形杆菌、肠细菌和不动杆菌都可能涉及此类腐败，但最频繁造成此类腐败的原因菌是产碱杆菌。在乡村干酪中，青霉、毛霉、交链孢霉和地衣丝霉均可良好生长，给产品带来陈腐味、霉味、腐臭味和发酵味等异味。在加拿大的阿尔贝它，人们发现工业化生产的乡村干酪其货架期主要受限于酵母和霉菌[24]。尽管 48%的新鲜样品中含有大肠杆菌，在 4℃下贮存 16d 后乡村干酪中的大肠杆菌数并未增加。有关发酵乳制品更详细的资料可见参考文献[10,18]。

7.2.3 干酪

所有的干酪都是牛乳经乳酸菌发酵制成的，其一般制作过程包含两个重要的步骤：

①牛乳预处理，并接种合适的乳酸菌发酵剂：发酵剂产生的乳酸与加入的凝乳酶一起促进凝乳的形成。根据凝乳加热程度不同，可以选择不同的干酪生产发酵剂。因为嗜热链球菌比其他任何一种通常使用的乳酸发酵剂更耐热，因此可用干煮过的凝乳中。在中度加热的凝乳中可接入嗜热链球菌和乳酸乳球菌的混合菌发酵剂。

②凝块后压缩去水，随后加盐：在成熟干酪制作中，还需一个合适条件下进行成熟的过程。

虽然大多数成熟干酪是利用乳酸菌代谢作用制成的，然而一些著名的干酪其特殊的特征产生于其他有关的菌种。在瑞士干酪制作中，保加利亚乳杆菌和嗜热链球菌混合发酵剂与薛氏丙酸菌（*Propionibaeterium shermanii*）一起使用，后者在干酪的成熟过程中对风味的形成和干酪孔的形成有作用（见图 7.1C、D 及有关丙酸菌代谢途径的简图和图 7.3 详细的代谢途径）。Hettinga 和 Reinbold[26]对这类细菌进行了详细的、广泛的研究。对诸如罗奎福特之类的干酪，生产中，在凝乳中通常接种罗奎福特青霉孢子，它可以促进成熟，并使这类产品具特有的蓝色纹理外观。卡门培尔干酪制作中可以在乳或卡门培尔干酪表面接种卡门培尔青霉孢子。

不管是成熟干酪还是未经成熟的干酪，也不管干酪的成熟是由细菌还是由霉菌完成，按它们的结构或水分含量，世界上 400 多种干酪可划分为不足 20 个类型。按结构可分为

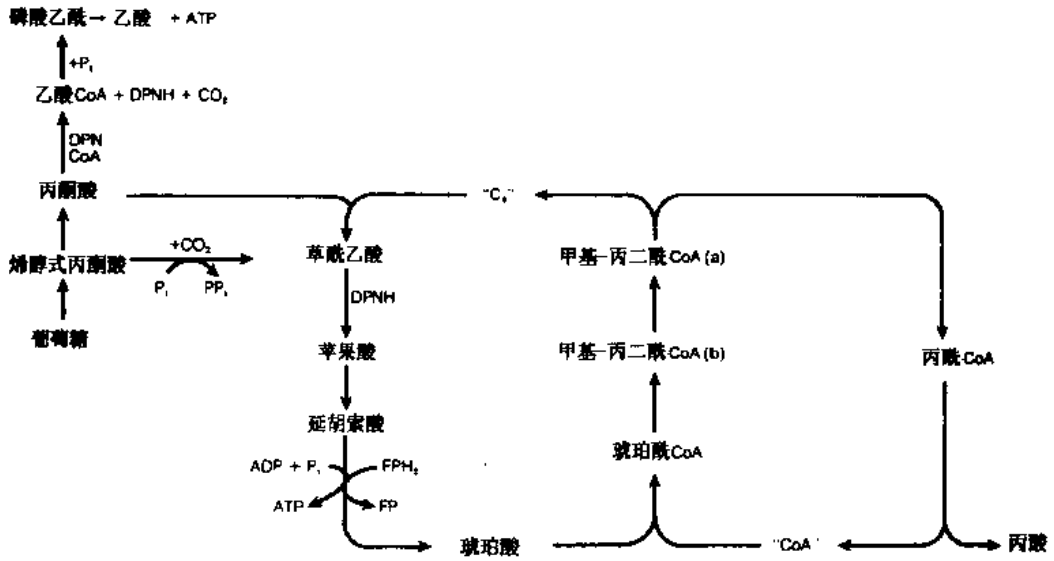


图 7.3　丙酸发酵的途径及乙酸、CO_2、丙酸和 ATP 的形成

注：甲基-丙二酰 CoA（a）及（b）是两种异构体；

FP 是黄素蛋白，FPH_2 是还原态黄素蛋白。

三类：硬、半硬和软干酪。硬干酪的例子有切达干酪、菠萝伏洛干酪、罗马诺干酪和伊丹干酪。所有硬干酪进行细菌成熟的时间为 2～16 个月。半硬干酪包括明斯特干酪、扁圆形荷兰干酪，其细菌成熟期为 1～8 个月。蓝色和罗奎福特干酪是由霉菌进行为期 2～12 个月成熟的半硬干酪的两个典型例子。林堡干酪是由细菌成熟的软性干酪，而布里干酪和卡门培尔干酪是由霉菌成熟的软干酪。不经成熟的干酪有乡村干酪、奶油干酪和纽沙特尔干酪。

虽然正如我们所预料的，霉菌可以并确实存在于硬质和半硬干酪中，但它们水分含量低的特点使它们对大多数微生物引起的腐败并不敏感。一些成熟干酪的低氧化还原电位，足以使厌氧菌生长。因此，在 A_w 适宜的情况下，在这类产品中发生由厌氧细菌导致的腐败是不足为奇的。梭状芽孢杆菌，尤其是巴氏固氮梭状芽孢杆菌、酪酸梭状芽孢杆菌、生芽孢梭状芽孢杆菌和酪丁酸梭状芽孢杆菌可造成干酪产气。其中酪丁酸梭状芽孢杆菌已被证实是导致扁圆形荷兰干酪丁酸发酵或产生后气孔（Late-blowing）缺陷的原因[30]。据报道，一种需氧芽孢菌——多黏芽孢杆菌（*B. polymyxa*）可导致干酪产气，产气的原因是微生物利用乳酸而产生 CO_2。

简式：1.5 葡萄糖＋6Pi＋6ADP ⟶ 6ATP＋$2H_2O$＋CO_2＋乙酸＋2 丙酸

7.3　发酵乳明确了的保健功能

关于一些发酵食品和（或）发酵菌菌体是否具保健功效争论已久，一些精心设计的研究认为有保健功能。然而，另一些研究则认为它无保健功能。一般认为发酵乳在三个方面可能对人体有益，即适合于乳糖不耐症人群消费牛乳、降低血中胆固醇含量及抗癌

活性。更多有关这些情况及其它信息可参阅 Deeeth 和 Tamine[9]、Friend 和 Shaham[14]、Richardson[43]及 Shahani 和 Ayebo[47]所写的有关综述文章。

7.3.1 乳糖不耐

乳糖不耐（乳糖不吸收）对成年哺乳动物，包括大多数成年人来说是正常情况，对乳糖不适应的人群数要高于适应者[31]。大多数能消化吸收乳糖的成年人主要是北欧人、美国白人及非洲的两个游牧部落的牧民[31]。当乳糖不耐者摄入一定量的乳或冰淇淋后，立即会出现肠胃胀气和腹泻。出现这种情况的原因是这部分人群肠内缺乏乳糖酶或酶的数量太少，乳糖无法正常分解，被结肠内的细菌利用，并产生气体。呼吸氢试验（breath hydrogen test）检验乳糖不耐症的原理就是：无法吸收的乳糖被厌氧或兼性厌氧的细菌利用，产生氢气，使氢气水平提高。

许多研究者已经发现，乳糖不耐症者可以饮用某些特定的发酵乳制品，而不会对其造成伤害；而另外的一些研究则认为发酵乳无此方面的功能。认为有益的理由是：在发酵乳中乳糖含量的降低以及摄入酸乳后发酵菌可分泌产生 β-半乳糖酶。在一项研究中，经 11d 贮存的酸乳其乳糖含量降低大约 1/2（至大约 2.3g/100g，没发酵前为 4.8g/100g），同时半乳糖的含量从原料乳中的微量上升至酸乳中的 1.3g/100g。同样的结果也出现于嗜酸乳杆菌酸乳及双歧杆菌酸乳中[3]。在一项用白鼠进行的试验中，动物被分别喂食含有酸乳、巴氏杀菌过的酸乳及配制酸乳的膳食，试验进行 7d，那些摄入含乳酸菌酸乳膳食的动物吸收半乳糖的能力有了增加，并且肠道中乳糖酶的含量也有了提高[19]。酸乳细菌在肠内可存活 3h，当 8 位乳糖不耐症者摄入酸乳或嗜酸菌乳时，他们没有出现任何摄入低脂牛乳时所产生的症状[3]。

曾有报道称，“甜”嗜酸菌乳可以防止产生一些乳糖不耐症的症状，然而另一些人发现这种产品无此功能。这种产品是由 M. L. Speck 和他的同事一起开发研制的，它由正常的巴氏杀菌乳和大量经冷冻干燥制成的菌体构成，后者含有大量活的嗜酸乳杆菌。这种产品只要保持在冷藏温度下，菌体就不会生长，但一旦饮用，消费者就可获得活菌带来的益处。之所以称其为“甜”酸乳是因为它缺乏传统酸乳固有的酸味。当 18 位患有乳糖酶缺乏症的病人饮用牛乳 1 个星期，接着饮用“甜”嗜酸菌乳 1 个星期，两种产品使病人出现乳糖不耐症的程度是一致的[37]。用白鼠做的试验表明，酸乳细菌在防止乳糖不耐方面的作用也很有限[14]，但鼠体内固有的乳酸菌被酸乳中的菌所压制，使其体内乳杆菌从以异型发酵为主转变为以同型发酵为主。

在评论上述相反的结论时，考虑一些因素的影响也许是重要的。这些因素包括：试验采用的乳酸菌株的种类、动物和人类消化道之间的基本差异性、试验对象患乳糖不耐症的程度。总的来说，乳酸菌可以改善乳糖不耐症症状的结论已经得到了证实。

7.3.2 胆固醇

研究酸乳对胆固醇的影响来自于对非洲一个名叫 Maasai 的部落的研究。尽管他们要消耗相当数量的肉类，但他们血液中胆固醇的含量却十分低，各种冠状动脉疾病的发生率也相当低。这与他们普遍每天喝 4～5L 酸乳有关[34]，虽然大量的证据支持这一肯定的

结论，但接下去大量的研究者对发酵菌是否真的具有降低人体胆固醇含量却心存疑惑。Richardson1977 年对此问题的研究已作了综述[43]。

以 26 人为研究对象，Mann[33]的一项研究表明：在膳食中大量摄入酸乳可以降低血液中胆固醇（cholesteremia），在酸乳中含有一种可以抑制从乙酸合成胆固醇的因子。这因子可能是 3-羟基-3-甲基葡糖酸和（或）乳清酸加嗜热乳（thermophilus milk）及嗜热乳对肝胆固醇的甲醇可溶物。研究人员发现，与对照值相比，这两种产物都能明显地降低肝胆固醇水平[42]。在另一项研究中，按主食加 10%嗜酸菌酸乳喂养白鼠 4 个星期，发现其降低血中胆固醇的能力比按不含酸乳的另两个食谱喂养的老鼠强得多[21]。而在有些研究中，一些人认为降低了胆固醇的合成作用是胆固醇含量降低的原因，另外细菌有从肠胃中清除胆固醇及其前体的能力。在 Gilliland[15]等人的研究中发现：两株从猪体中分离得到的嗜酸乳杆菌有在胆汁存在的环境中生存的能力。在厌氧条件下，其中一株嗜酸杆菌在有胆汁存在的实验培养基中吸收分解的胆固醇，并可明显地抑制喂以高胆固醇膳食的猪血中胆固醇量的增加。而另一株在实验培养基中不能清除胆固醇，给猪喂食时也不能降低其血中胆固醇水平。于是这些研究者提出：一些嗜酸乳杆菌菌株可以直接作用于肠胃中的胆固醇，以降低血液中的胆固醇含量。近期研究发现，在 32℃下弗罗伊登氏丙酸杆菌（*Propionibacterium freudenreichii*）在培养基中生长 10～14d 后可使胆固醇量降低 50%[49]。菌体并没有分解胆固醇的能力，因为从水洗后的菌细胞中可分离得到高达 70%的该化合物。

总共 68 个志愿者（年龄 18～26 岁），以 10 或 13 人为一组，按下列提供的食物进行试验：原料乳、全脂乳、脱脂乳、酸乳、酪乳及“甜”嗜酸菌乳。这样的摄食规律保持 3 个星期。实验的结果表明：酸酪乳、酸乳和嗜酸乳对血中胆固醇含量的降低没有显著的功效[54]。另一项用小白鼠进行的试验，以食物加由嗜热链球菌、保加利亚乳杆菌和嗜酸乳杆菌制成的酸乳对白鼠进行 4 个星期的喂养，并设计对照组共同进行试验。结果也表明，白鼠体内血浆中胆固醇量并未有明显的改变。

7.3.3 抗癌功能

最早发现乳酸菌有抗癌功能的是前苏联的 I. G. Bogdanov 和他的同事们（1962 年）[47]，他们证实了酸乳对肉瘤及肿癌的抑制作用。在动物试验中，许多研究者用酸乳和酸乳抽提物、嗜酸乳杆菌、保加利亚乳杆菌、干酪乳杆菌及这些菌体的抽提物进行实验，证实了抗癌功效。shahani 和 Ayebo[47]及 Friend 和 Shahani[13]已对这方面研究的成果进行了综述。

Goldin 和 Gorback[18]以 18 人为试验对象，进行了口服嗜酸乳杆菌对粪细菌酶活力影响的试验。分析的酶是 β-葡糖苷酸酶、硝基还原酶和偶氮还原酶（azoreductase），因为这些酶能间接作用于前体致癌物，使其变成致癌物。整个试验过程中，其食谱的变化是这样的：4 个星期空白、4 个星期普通牛乳、4 个星期空白、4 个星期含 2×10^6 个/m^2 活菌的嗜酸菌乳、4 个星期空白。试验结果表明，只有在服用乳酸菌阶段，所有试验者粪中 3 种酶的活力可降低 2～4 倍；在最后 4 个星期的空白对照阶段中，3 种酶的活力又恢复正常。相似的报道虽然也有，但数量不是很多。上述结论对预防与膳食结构有关的结肠

癌有重要的意义。

7.4 乳酸菌导致的疾病

虽然乳酸菌对人和动物的保健功能方面的作用是不容置疑的，但乳酸菌中的一些菌与人类某些疾病有关。Aguirre 和 Collins[1]在对这方面情况做了总结后指出，在过去的 50 年间大约有 68 起有关乳酸菌与人类临床疾病有关的报道。7 年中，涉及明串珠菌属菌种的大约有 27 起；3 年中，涉及片球菌属菌种的有 18 起；大多数报导涉及肠球菌，肠球菌是导致医院感染（在医院里获得）的第三大原因菌，其中粪肠球菌（*E. faecalis*）和粪渣肠球菌（*E. faecium*）是最常见的两种菌。这表明乳酸菌感染的对象主要是处于健康非正常态的人群。

参 考 文 献

[1] Aguirre, M., and M D. Collins. 1993. Lactic acid bacteria and human clinical infection. *J. Appl. Bacteriol.* 75: 95～107.

[2] Allen, S. H. G., R. W. Killermeyer, R. L. Stjernholm, and H. G. Wood. 1964. Purification and properties of enzymes involved in the propionic acid fermentation. *J. Bacteriol.* 87: 171～187.

[3] Alm, L. 1982. Effect of fermentation of lactose, glucose, and galactose content in milk and suitability of fermented milk products for lactose intolerant individuals. *J. Dairy Sci.* 65: 346～352.

[4] Arnott, D. R., C. L. Duitschaever, and D. H. Bullock. 1974. Microbiological evaluation of yogurt produced commercially in Ontario. *J. Milk Food Technol.* 37: 11～13.

[5] Bhadsavle, C. H., T. E. Shehata, and E. B. Collins. 1972. Isolation and identification of psychrophilic species of *Clostridium* from milk. *Appl. Microbiol.* 24: 699～702.

[6] Brown, W. V., and E. B. Collins. 1977. End products and fermentation balances for lactic streptococci grown aerobically on low concentrations of glucose. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 38～42.

[7] Collins, E. B. 1972. Biosynthesis of flavor compounds by microorganisms. *J. Dairy Sci.* 55: 1022～1028.

[8] Davis, J. G. 1975. The microbiology of yoghourt. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, ed. J. G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting, eds., 245～263. New York: Academic Press.

[9] Deeth, H. C., and A. Y. Tamime. 1981. Yogurt: Nutritive and therapeutic aspects. *J. Food Protect.* 44: 78～86.

[10] Dirar, H. A. 1993. *The Indigenous Fermented Foods of the Sudan.* Oxon, England: CAB International

[11] Doelle, H. A. 1975. *Bacterial Metabolism.* New York: Academic Press.

[12] Foster, E. M., F. E. Nelson, M. L. Speck, R. N. Doetsch, and J. C. Olson, 1957. *Dairy Microbiology.* Englewood Cliffs, NJ: Prentice-Hall.

[13] Friend, B. A., and K. M. Shahani. 1984. Antitumor properties of lactobacilli and dairy products fermented by lactobacilli. *J. Food Protect.* 47: 717～723.

[14] Garvie, E. I., C. B. Cole, R. Fuller, and D. Hewitt. 1984. The effect of yoghurt on some components of the gut microflora and on the metabolism of lactose in the rat. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 237～245.

[15] Gilliland, S. E., C. R. Nelson, and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 377～381.

[16] Gilliland, S. E., and M. L. Speck. 1974. Frozen concentrated cultures of lactic starter bacteria: A review. *J. Wilk Food Technol.* 37: 107～111.

[17] Goel, M. C., D. C. Kulshrestha, E. H. Marth, D. W. Francis, J. G. Bradshaw, and R. B. Read, Jr. 1971. Fate of coliforms in yogurt, buttermilk, sour cream, and cottage cheese during refrigerated storage. *J. Milk Food Technol.* 34: 54～58.

[18] Goldin, B. R., and S. L. Gorbach. 1984. The effect of milk and lactobacillus feeding on human intestinal bacterial enzyme activity. *Amer. J. Clin. Nutr.* 39: 756～761.

[19] Goodenough. E. R., and D. H. Kleyn. 1976. Influence of viable yogurt microflora on digestion of lactose by the rat. *J. Dairy Sci.* 59: 601～606.

[20] Goodenough, E. R., and D. H. Kleyn. 1976. Qualitative and quantitative changes in carbohydrates during the manufacture of yoghurt. *J. Dairy Sci.* 59: 45～47.

[21] Grunewald, K. K. 1982. Serum cholesterol levels in rats fed skim milk fermented by *Lactobacillus acidophilus*. *J. Food Sci.* 47: 2078～2079.

[22] Gunsalus, I. C., and C. W. Shuster. 1961. Energy yielding metabolism in bacteria. In *The Bacteria*, ed. I. C. Gunsalus and R. Y. Stanier, vol. 2, 1～58. New York: Academic Press.

[23] Hamann, W. T., and E. H. Marth. 1984. Survival of *Streptococcus thermophilus* and *Lactobacillus bulgaricus* in commercial and experimental yogurts. *J. Food Protect.* 47: 781～786.

[24] Harlander, S. K., and L. L. McKay. 1984. Transformation of *Streptococcus sanguis* Challis with *Streptococcus lactis* plasmid DNA. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 342～346.

[25] Harlander, S. K., L. L. McKay, and C. F. Schachtels. 1984. Molecular cloning of the lactosemetabolizing genes from *Streptococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 347～351.

[26] Hettinga, D. H., and G. W. Reinbold. 1972. The propionic-acid bacteria—A Review. *J. Milk Food Technol.* 35: 295～301, 358～372, 436～447.

[27] Hitchins, A. D., and F. E. McDonough. 1989. Prophylactic and therapeutic aspects of fermented milk. *Amer. J. Clin. Nutr.* 49: 675～684.

[28] Hosty, T. S., and C. I. McDurmont. 1975. Isolation of acid-fast organisms from milk and oysters. *Hlth Lab. Sci.* 12: 16～19.

[29] Johnson, M. G., and E. B. Collins. 1973. Synthesis of lipoic acid by *Streptococcus faecalis*10C1 and end-products produced anaerobically from low concentrations of glucose. *J. Gen. Microbiol.* 78: 47～55.

[30] Klijn, N., F. F. J. Nieuwenhof, J. D. Hoolwerf, C. B. van der Waals, and A. H. Weerkamp. 1995. Identification of *Clostridium tyrobutyricum* as the causative agent of late blowing in cheese by species-specific PCR amplification. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2919～2924.

[31] Kretchmer, N. 1972. Lactose and lactase. *Sci. Am.* 227 (10): 71～78.

[32] London, J. 1976. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Ann. Rev. Microbiol.* 30: 279～301.

[33] Mann, G. V. 1977. A factor in yogurt which lowers cholesteremia in man. *Atherosclerosis* 26:

335～340.

[34] Mann, G. V., and A. Spoerry. 1971. Studies of a surfactant and cholesteremia in the Masai. *Amer. J. Clin. Nutr.* 27: 464～469.

[35] Marth, E. H. 1974. Fermentations. In *Fundamentals of Dairy Chemistry*, ed. B. H. Webb, A. H. Johnson, and J. A. Alford, eds., ch, 13 Westport, Conn.; AVI.

[36] Mundt, J. O. 1975. Unidentified streptococci from plants. *Int. J. system. Bacteriol.* 25: 281～285.

[37] Newcomer, A. D., H. S. Park, P. C. O'Brien, and D. B. McGill. 1983. Response of patients with irritable bowel syndrome and lactase deficiency using unfermented acidophilus milk. *Amer. J. Clin. Nutr.* 38: 257～263.

[38] National Academy of Science, USA. 1992. *Applications of Biotechnology to Traditional Fermented Foods*. Washington, DC: National Academy Press.

[39] Pederson, C. S. 1979. *Microbiology of Food Fermentations*, 2d ed. Westport, CT: AVI.

[40] Prescott, S. C., and C. G. Dunn. 1957. *Industrial Microbiology*. New York: mcGraw-Hill.

[41] Radke-Mitchell, L., and W. E. Sandine. 1984. Associative growth and differential enumeration of *Streptococcus thermophilus and Lactobacillus bulgaricus*: A review. *J. Food Protect.* 47: 245～248.

[42] Rao, D. R., C. B. Chawan, and S. R. Pulusani. 1981. Influence of milk and thermophilus milk on plasma cholesterol levels and hepatic cholesterogenesis in rats. *J. Food Sci.* 46: 1339～1341.

[43] Richardson, T. 1978. The hypocholesteremic effect of milk—A review. *J. Food Protect.* 11: 226～235.

[44] Roth, L. A., L. F. L. Clegg, and M. E. Stiles. 1971. Coliforms and shelf life of commercially produced cottage cheese. *Can. Inst. Food Technol. J.* 4: 107～111.

[45] Sandine, W. E., P. C. Radich, and P. R. Elliker. 1972. Ecology of the lactic streptococci. Areview. *J. Milk Food Technol.* 35: 176～185.

[46] Schleifer, K. H., and O. Kandler. 1972. Peptidoglycan types of bacterial cell walls and their taxonomic implications. *Bacteriol. Rev.* 36: 407～477.

[47] Shahani, K. M., and A. D. Ayebo. 1980. Role of dietary lactobacili in gastrointestinal microecology. *Amer. J. Clin. Nutr.* 33: 2448～2457.

[48] Shehata, T. E., and E. B. Collins. 1971. Isolation and identification of psychrophilic species of *Bacillus* from milk. *Appl. Microbiol.* 21: 466～469.

[49] Somkuti, G. A., and T. L. Johnson. 1990. Cholesterol uptake by *Propionibacterium freundenreichii*. *Curr. Microbiol.* 20: 305～309.

[50] Speckman, R. A., and E. B. Collins. 1968. Diacetyl biosynthesis in *Streptococcus diacetilactis* and *Leuconostoc citrovorum*. *J. Bacteriol.* 95: 174～180.

[51] Speckman, R. A., and E. B. collins. 1973. Incorporation of radioactive acetate into diacetyl by *Streptococcus diacetilactis*. *Appl. Microbiol.* 26: 744～746.

[52] Stamer, J. R. 1976. Lactic acid bacteria. In *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*, ed. M. P. deFigueiredo and D. F. Splittstoesser, 404～426. Westport, CT: AVI.

[53] Stouthamer, A. H. 1969. Determination and significance of molar growth yields. *Meth. Microbiol.* 1: 629～663.

[54] Thompson, L. U., D. J. A. Jenkins, M. A. Vic Amer, R. Reichert, A. Jenkins, and J.

Kamulsky. 1982. The effect of fermented and unfermented milks on serum cholesterol. *Amer. J. Clin. Nutr.* 36: 1106～1111.

[55] Yokota, A., T. Tamura, M. Takeuchi, N. Weiss, and E. Stackebrandt. 1994. Transfer of *Propionibacterium innocuum* Pitcher and Collins 1991 to *Propioniferax* gen. nov. as *Propioniferax innocua* comb. now. *Int. J. System. Bacteriol.* 44: 579～582.

8. 新鲜和发酵果蔬产品

尽管有例外，在土壤中生长的蔬菜的微生物菌相可以反映该土壤的微生物分布情况。第二部分 2 中表 2.1 中列出了在土壤中常见的细菌和原生动物，同时还列举了那些依附于农作物，成为新鲜农产品的生物群区的一部分细菌和原生动物。放线菌〔G（+）分枝形〕是土壤中数量最多的细菌，但是它们与蔬菜产品有关的报告则很少见。另一方面，乳酸细菌在土壤中很少发现，而它们又是农作物及农产品中重要的细菌。农作物产品直接接触土壤，为微生物污染提供很多机会。许多水果和蔬菜的保护层和 pH（低于这些 pH 许多微生物不能生长）是影响这些产品微生物学特性的重要因素。

本部分力图对水果和蔬菜区别对待，尽管这样做很困难，在一般意义上，像西红柿及黄瓜这些产品被称作蔬菜，但是从植物学的角度上它们是水果。柠檬、橘子、酸橙无论在植物学角度，还是普通意义上都是水果。总之，水果和蔬菜的区分仍以 pH 为依据，不管其是否缺乏科学价值。

8.1 新鲜和冷冻蔬菜

蔬菜中微生物的数量可以反映蔬菜在加工过程中的卫生质量及加工时原材料的微生物污染情况，在一项关于热烫前绿蚕豆的微生物情况的研究中，Splittstoesser 等人[64]发现，两种生产原料的总菌数在（lg5.60～lg6.0）/g 以上。热烫之后，总菌数减至(lg3.0～lg3.6）/g。经过各种加工过程和包装，总菌数又升至（lg4.72～lg5.94）/g。至于法式蚕豆，微生物数量最大增加发生在切片之后，同样的情况也发生在豌豆和玉米中。从三家工厂采集的、未经热烫的绿蚕豆其总菌数在（lg4.94～lg5.95）/g。总菌数在热烫之后会减少，而在每一步加工过程后又会连续增加。在对整玉米的实验中，热烫后的玉米在切割及经过输送带传送至清洗机后，其总菌数都将有所上升。虽然热烫后当时的总菌数大约为 lg3.48/g，而包装后产品的总菌数将达 lg5.94/g。豌豆、菜豆和玉米中 40%～75% 的菌是由明串珠菌和链球菌组成的。而许多革兰氏阳性、过氧化氢酶阳性的杆菌似乎是棒状杆菌[62,63]。

乳酸球菌与许多未经加工和加工过的蔬菜有关。在冷冻豌豆、菜豆和玉米中 41%～75% 的 APC 值是由这些菌构成的[59]。现已证实：在所有经加工的新鲜豌豆、青刀豆和玉米中都可能含有凝结酶阳性的葡萄球菌[62]。而豌豆中该菌的含量最高，达 lg0.86/g，而 64% 的玉米样品中含该类菌。同时，一些研究者发现，当蔬菜经过各个连续的加工过程后，葡萄球菌的数量会有一个积聚的过程。这种菌的主要污染源是操作者的手。虽然葡萄球菌可能在蔬菜的生产过程中检出，但它们在更高数量的正常乳酸菌群存在的情况下通常不可能增生。肠杆菌（并非大肠杆菌）和肠球菌在蔬菜加工过程中的主要阶段都可检出，但它们的存在似乎对公共卫生并无危害[60]。

在一项对 100 个商场购买的冷冻真空包装蔬菜样品肉毒梭状芽孢杆菌检出率情况的研究中，50 个带筋青刀豆样品中没有检出该菌；但在 50 个菠菜样品中，6 个含有 A 和 B 型该菌孢子[21]。一些蔬菜的微生物数量列于表 8.1 和表 8.2。

表 8.1　　一些新鲜蔬菜中的微生物数量

产　品	微生物数（lgcfu/g）	参考文献
红绿菊苣和胡萝卜混合物	APC 7.94 大肠菌群 7.03 粪大肠菌群 6.74 乳酸菌 6.18	75
红菊苣、菊苣和胡萝卜混合物	APC 6.14 大肠菌群 4.68 粪大肠菌群 4.51 乳酸菌 5.86	75
豆　芽	APC 7.26、7.99 大肠菌群 7.49、6.99	22
硬花甘蓝	APC 3.97	48
胡萝卜	APC 4.20	48
花　菜	APC 6.97	48
芹　菜	APC 10.0	48
卷心菜丝	APC 7.00	48
红萝卜	APC 6.04	48

注：APC—有氧平板计数值。

表 8.2　　冷冻蔬菜的一般微生物指标

产　品	样品数	微生物种类/目标要求	符合要求的产品量/%	参考文献
花　菜	1556	35℃APC<10^5/g 大肠菌群 MPN<20/g 大肠杆菌 MPN 3/g	75 79 98	5
玉　米	1542	35℃APC<10^5/g 大肠菌群 MPN<20/g 大肠杆菌 MPN 3/g	94 71 99	5
豌　豆	1564	35℃APC<10^5/g 大肠菌群 MPN<20/g 大肠杆菌 MPN 3/g	95 78 99	5
热烫过的蔬菜（17 个品种）	575	无粪大肠菌群 $n=5$，$c=3$，$m=10$ 和 $M=10^3$ $n=5$，$c=3$，$m=50$ 和 $M=10^3$	63 63 70	63
切段的青刀豆、菠菜叶、豌豆	144	平均 APC lg4.73/g～lg4.93/g	—	60

续表

产　品	样品数	微生物种类/目标要求	符合要求的产品量/%	参考文献
菜豆、玉米、甘蓝嫩枝	170	平均 APC lg5.30/g～lg5.36/g	—	60
法式青刀豆、切碎的南瓜、蔬菜	135	平均 APC lg5.48/g～lg5.51/g		60
切碎的菠菜和花菜	80	平均 APC lg5.54/g～lg5.65/g		60
切碎的硬花甘草	45	平均 APC lg6.26/g		60

注：APC＝有氧平板计数值；MPN＝最大可能值。

Splittstoesser 和 Gorlett[60]在对来自美国 12 个州的 24 个工厂生产的 575 件包装冷冻蔬菜进行研究后发现，豌豆的总菌数最低（平均约为 lg1.93/g），而切碎的花菜中含菌量最高，平均 APC 值为 lg3.26/g。按照国际食品微生物标准委员会（ICMSF）的三级样品方法，按 $m=10^5$/g 的标准，115 份样品的合格率为 74%；而按 $M=10^6$/g 的标准，合格率为 84%。对 17 种不同的冷冻热烫蔬菜样品进行研究后发现，63%的样品是粪大肠杆菌阴性。当 $n=5$，$c=3$，$m=10$ 和 $M=10^4$ 时，565 个受检样品中 33%是合格的；如取 $n=5$，$c=3$，及 $M=10^3$ 时，70%是合格的[61,62]。在另一项研究中，1556 份零售冷冻花菜在 30℃时的 APC 值为 lg4.65/g；同样培养条件下，1542 份冷冻玉米样品的 APC 值为 lg3.93/g；1564 份冷冻豌豆样品的 APC 值为 lg3.83/g，且所有样品的大肠菌群值均小于 5 个/g[5]。根据 APC 值及 ICMSF 的三级样品方法 $n=5$，$c=3$，$m=10^5$ 和 $M=10^6$，冷冻豌豆的合格率为 97.2%～99.6%。

8.1.1 腐败

高等植物的一般成分列于表 8.3 中，21 种普通蔬菜的化学成分也列于表 8.4 中。蔬菜中平均含水量为约 88%、碳水化合物的平均含量为 8.6%，蛋白质的平均含量为 1.9%，脂肪的平均含量为 0.3%，灰分的平均含量为 0.84%。维生素、核酸及其它成分的总量一般低于 1%。从营养角度讲，霉菌、酵母和细菌都可以在蔬菜上生长。相对低的碳水化物和脂肪含量意味着这些水大多是以可利用形式存在的。大多数蔬菜的 pH 范围是在大量细菌适宜生长的范围。因此，细菌是蔬菜腐烂的常见原因菌也就不足为奇了。蔬菜的相对较高的氧化-还原电位及不存在高毒性意味着在引起蔬菜腐烂的菌中，需氧和兼性厌氧的菌比厌氧菌更易生长。最常见的一些引起蔬菜细菌性腐烂的病原菌是欧氏植病杆菌属中的一些菌种，其种类与植物和蔬菜生长的自然环境有关。这些菌造成的蔬菜腐烂被称为细菌性软腐病。

表 8.3 高等植物材料的一般化学成分

碳水化合物及相关化合物

①多糖：戊聚糖（阿拉伯聚糖）、己聚糖（纤维素、淀粉、木聚糖、果聚糖、甘露聚糖、半乳糖体）

②低聚糖：四糖（水苏四糖）、三糖（蜘槐糖、三聚甘露糖、棉籽糖）、二糖（麦芽糖、蔗糖、纤维二糖、蜜二糖、海藻糖）

③单糖：己糖（甘露糖、葡萄糖、半乳糖、果糖、山梨糖）、戊糖（阿拉伯糖、木糖、核糖、L-鼠李糖、L-岩藻糖）

④糖醇：甘油、核糖醇、甘露醇、山梨醇、纤维醇

⑤糖酸：糖醛酸、抗坏血酸

⑥酯：单宁

⑦有机酸：柠檬酸、莽草酸、D 酒石酸、酢浆草酸、乳酸、羟基乙酸、丙二酸等

蛋白质：白蛋白、球蛋白、谷蛋白、醇溶蛋白、多肽和氨基酸

脂质：脂肪酸、脂肪酸酯、磷脂、糖酯等

核酸及衍生物：嘌呤和嘧啶碱基、核苷酸酯等

维生素：脂溶性（维生素 A、维生素 D、维生素 E）、水溶性（维生素 B_1、维生素 B_2、维生素 B_5 等）

无机盐：Na、K、Mg、Ca、Mn、Fe 等

水

其它：生物碱、卟啉及芳香族化合物

表 8.4 蔬菜食物的化学成分 单位：%

蔬　菜	水	碳水化合物	蛋白质	脂　肪	无机盐
绿色蚕豆	89.9	7.7	2.4	0.2	0.8
甜菜	87.6	9.6	1.6	0.1	1.1
硬花甘蓝	89.9	5.5	3.3	0.2	1.1
比京芽菜	84.9	8.9	4.4	0.5	1.3
卷心菜	92.4	5.3	1.4	0.2	0.8
甜瓜	94.0	4.6	0.2	0.2	0.6
花菜	91.7	4.9	2.4	0.2	0.8
芹菜	93.7	3.7	1.3	0.2	1.1
玉米	73.9	20.5	3.7	1.2	0.7
黄瓜	96.1	2.7	0.7	0.1	0.4
莴苣	94.8	2.9	1.2	0.2	0.9
洋葱	87.5	10.3	1.4	0.2	0.6
豌豆	74.3	17.7	6.7	0.4	0.9
土豆	77.8	19.1	2.0	0.1	1.0
南瓜藤	90.5	7.3	1.2	0.2	0.8
红萝卜	93.6	4.2	1.2	0.1	1.0
菠菜	92.7	3.2	2.3	0.3	1.5
伏季南瓜	95.0	3.9	0.6	0.1	0.4
甘薯	68.5	27.9	1.8	0.7	1.1
西红柿	94.1	4.0	1.0	0.3	0.6
西瓜	92.1	6.9	0.5	0.2	0.3
平均	88.3	8.6	0.3	2.0	0.8

8.1.1.1 细菌病原体

细菌性软腐病：这种类型的腐烂是由胡萝卜软腐病欧氏杆菌和诸如莴苣叶斑病假单胞菌（*Pseudomonas marginalis*）等假单胞菌引起的，而特别是以前者为主。也涉及芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌属的菌，但它们的影响是次要的。

病原菌可以分解果胶，使蔬菜组织软化、发黏，有时还有异味和似水浸泡过的外形。受此病害作用的果蔬有芦笋、洋葱、大蒜、豆类（青刀豆、利马菜豆、白刀豆）、胡萝卜、防风草、芹菜、皱叶欧芹、甜菜、菊苣、球蓟、莴苣、大黄根、菠菜、土豆、卷心菜、比京芽菜、花菜、硬花甘蓝、红萝卜、羽衣甘蓝、大头菜、西红柿、黄瓜、甜瓜、胡椒和西瓜。

虽然欧氏植病杆菌引起软腐病的确切机理还不清楚，但可能的机理是：蔬菜收获时，这些菌存在于易受此病害的蔬菜中，并寄居于蔬菜的汁液中，直至营养供给耗尽。植物的根茎由于存在过氧化氢和过氧化物，故可以阻止细菌的侵入，但可侵入的菌体会产生过氧化氢酶和过氧化物歧化酶来破坏这种防御功能。丁香假单胞菌（*Pseudomonas syringae*）与欧氏植病杆菌一样可以分泌这些酶类。

蔬菜中存在的胶质物质会诱导果胶酶的形成，后者可以水解果胶，使产品发黏。已证实，土豆组织软化是欧氏植病杆菌分泌的 endcpolygalacturonate transeliminase 酶作用的结果[33]。在易受细菌病原体侵袭的蔬菜上，由于这些菌一般生长在早期，并且生长速度相对较快，使霉菌的生长受到排挤，因此对这类蔬菜腐烂的影响也较小。一旦植物的外围防护组织被分泌果胶酶的菌破坏后，无果胶酶分泌能力的菌，毫无疑问也将进入植物组织中，对植物组织中存在的简单碳水化合物进行发酵作用。侵入组织内的菌可利用植物组织中存在的简单含氮物、维生素（尤其是 B 族维生素）和无机盐继续生长繁殖，直至蔬菜被完全消耗、破坏。菌群产生的一些挥发性化合物（例如 NH_3、挥发性酸等）使蔬菜产生恶臭。当细菌在酸性介质中生长时，它们可造成氨基酸的脱羧反应，生成的胺可使底物的 pH 升高，直至达到接近或超过中性 pH。复杂的碳水化合物，例如纤维素，往往最后被分解。由于还无法确定欧氏植病杆菌是否参与了这一反应，因此一般认为纤维素的分解作用是由霉菌及其它土壤菌等引起的。芳香族和卟啉化合物直至最后才被土壤中的各种菌群作用而降解。

已对胡萝卜软腐病欧氏杆菌胡萝卜亚种中与土豆块茎软化有关的基因进行了克隆。含克隆 DNA 的质粒体催化产生内果胶水解酶、外果胶水解酶、内多聚半乳糖醛酸酶和纤维素酶[51]。含克隆基因的大肠杆菌质体，已证实含有可使土豆块茎薄片软化的内果胶水解酶及内多聚半乳糖水解酶或外果胶水解酶。这类细菌中的这些酶系以及磷脂酶 C 和磷脂酶 A 参与了软腐作用。被根癌土壤杆菌（*Agrobacterium tumefaciens*）侵染的胡萝卜因为其乙烯合成增加而使其变老的速度加快。在正常的、未经侵染的植物中，植物生长激素调节乙烯的合成，但是根癌土壤杆菌会增强吲哚乙酸（indoleace acid）的合成，从而导致乙烯浓度的增高。

欧氏植病杆菌属于肠细菌家族成员。这些菌的种类通常与发生软腐和枯萎病的植物有关。它们与变形杆菌属、赛氏杆菌属、埃希氏杆菌属、沙门氏菌属及其它属菌一样是革兰氏阴性菌。欧氏植病杆菌的生长一般不需要有机氮化合物，蔬菜中相对低的蛋白质

含量使破坏这类植物物质的“任务”较轻，这对欧氏植病杆菌的生长是有利的。因为植物中实际存在的胶质物质是原果胶，因此欧氏杆菌分泌的果胶酶实际上是原果胶酶。许多欧氏植病杆菌，例如胡萝卜软腐病欧氏杆菌，有发酵利用某些蔬菜中存在的许多糖和醇的能力。这些糖和醇包括鼠李糖、纤维二糖、阿拉伯糖、甘露醇等，而其它许多普通的细菌不能利用这些物质。虽然，大多数的欧氏植病杆菌在约 37℃下生长良好，但其大多数也可在冷藏温度下良好生长，有些菌株可在 1℃下生长。

其它细菌性腐败情况：*E. carotovora PV. atroseptica*，*E. carotovora PV. atroseptica* 和菊欧文氏杆菌（*E. chrysanthemi*）造成西红柿的腐烂有时称为“黑腿（black leg）”。在一般温度区域，*E. carotovora PV. atroseptica* 与菊欧文氏杆菌造成的影响通常较小。虽然直接与土壤接触可能是这些菌正常型的来源，但 L-型变种也可进入健康组织中，并在随后变异为正常型的菌[23]。

黄单胞菌属（*Xanthomonas*）正在进行重新分类，因此在表 8.5 中列出的种和 *Pathovars* 名称可能已改变。最近的研究发现了 20 个 DNA 同源组，每一组中的菌被认为是同一基因种类[74]。田野黄单胞菌（*X. campestris*）经修正后只包括从十字科（卷心菜、芥菜）等来的 *Pathovars*[74]，地毯草黄单胞菌（*X. axonopodis*），现在包含了 34 个从前属于 *X. campestris pathovars* 的菌[74]。虽然该属的分类情况还不确定，但这属菌中包含了许多重要的植物致病菌和腐败菌，其大多数形成黄色黏液状的光滑菌落，并分泌黄色的 Xanthomonadins。由于黄原胶而形成黏液状菌落是该属菌的特征[74]。

一些使果蔬在田野和贮存过程中发生腐烂的重要菌列于表 8.5 中。所有列出的属和种正面临着分类上的改变。植物棒状杆菌就面临着多重选择，许多原来该属中的菌已不在该属之列，一些已被列至 *Curtobacter* 属中。造成植物致病和田野腐败的假单胞菌和黄单胞菌也是互异的。

表 8.5　　导致蔬菜在田间或贮存过程中腐败的一些细菌

菌　　种	腐败情况
番茄溃疡病棒状杆菌	维管的枯萎、溃疡；在西红柿叶和果上产生斑点
C. nebraskense	叶子斑点，叶枯萎和玉米的枯萎
马铃薯环腐棒状杆菌	白土豆的块茎腐烂
菜豆萎蔫棒状杆菌	豆类的细菌性枯萎
P. agarici 和托拉氏假单胞菌	蘑菇的菌折
P. corrupata	西红柿髓坏死
菊莴叶假单胞菌群	卷心菜和莴苣的细菌条纹斑点
莴苣叶斑病假单胞菌群	蔬菜的软腐病、莴苣的端头发黏
栖菜豆假单胞菌群	豆的光圈形枯萎
丁香假单胞菌群（*P. syringae group*）	
以前的大豆叶斑病假单胞菌	大豆的病害
以前的黄豆角斑病假单胞菌	黄瓜的角型叶子斑点
番茄叶假单胞菌群（*P. tomato group*）	西红柿的细菌性斑点

续表

菌　　种	腐败情况
田野黄单胞菌	
PV. campestris	卷心菜和花菜的黑斑
稻黄单胞菌（*X. oryzae*）	
PV. oryzae	稻米的细菌性枯萎
PV. oryzicola	稻米的细菌性叶子条纹

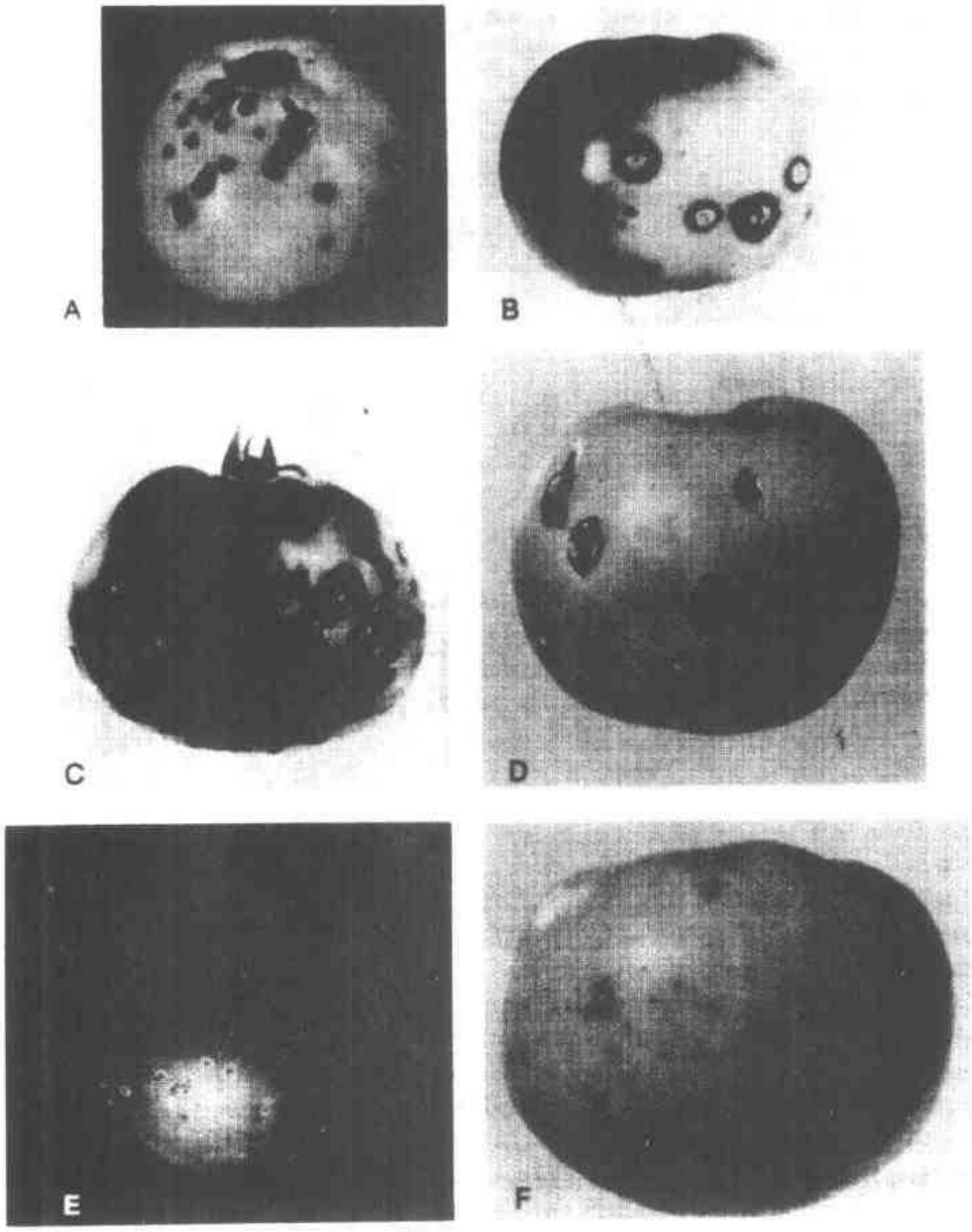


图 8.1　土豆病害（摘自“鲜土豆的真菌和细菌性疾病”，农业手册，第 28 页，美国农业部，1968）
A、B—钉头斑　C、D—细菌斑　E—细菌溃疡　F—细菌斑

图 8.1 和图 8.2 所列的是一些市售蔬菜遭受细菌和真菌腐烂的变化情况。

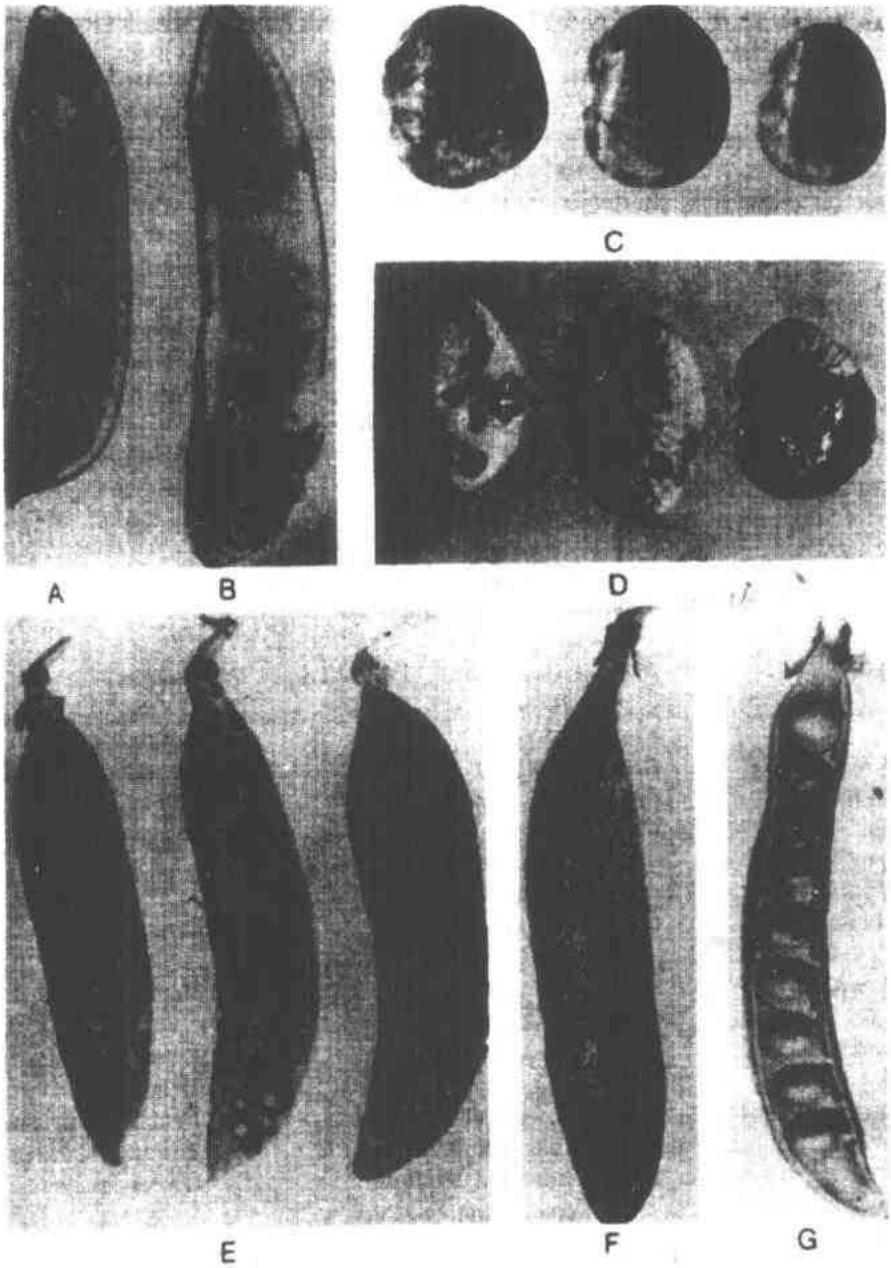


图 8.2　利马豆荚病害　A、B—豆荚枯萎　C—种子斑　D—酵母斑
豌豆病害　E—豆荚斑　F—炭疽病　G—疤
（摘自农业手册第 303 页，美国农业部，1966，第 5 章）

8.1.1.2　真菌病原体

果蔬常发生的一些腐烂情况列于表 8.6 中。其中的一些发生在收获之前，而其它的一些腐烂情况发生在收获之后。前一种腐烂的例子有：葡萄孢属菌侵入草莓的花叶中，导致灰霉腐烂；炭疽病毛盘孢侵入香蕉的外皮导致香蕉的炭疽病；盘圆孢（*Gloeosporium*）

侵入苹果的皮孔而造成苹果的皮孔腐烂[138]。大量的市售果蔬腐烂发生在收获之后，虽然真菌最易侵入碰伤及受损的产品，但一些也可以侵入果蔬的某些特殊部位。例如：串珠根霉(*Thielaviopsis*)侵入香蕉的冠头部位而使香蕉发生冠顶腐烂(banana crown rot)[139]。甘薯的黑色腐烂（Black. rot）是由甘薯中斑病菌（*Ceratocystis*）引起的；洋葱颈烂（neck rot）是葱腐葡萄孢（*Botrytis allii*）引起的；莴苣的downey霉变是由盘根霉（*Bremia*）属菌引起的[141]。表8.6中所列的一些腐败情况将在下面作进一步的讨论。

表 8.6　　普通真菌引起的果蔬腐烂情况、病原体和受影响的典型产品

腐烂情况	病　原　体	受影响的典型产品
交链孢霉腐烂	纤细交链孢霉	柑橘
炭疽病（苦斑）	*Colletotrichum musae*	香蕉
炭疽病	菜豆毛盘孢	豆类
	葫芦科毛盘孢	西瓜
黑色腐烂（斑）	黑曲霉	洋葱
黑色腐烂（斑）	甘薯黑斑病菌	甘薯
蓝色霉斑	指状青霉	柑橘类
褐色斑	果生链核盘菌	桃，樱桃
褐色斑	疫霉	柑橘
Cladosporium rot	草本枝孢（*C. herbarum*）	樱桃、桃
冠顶腐烂	香蕉盘圆孢、可可轮枝孢	香蕉
	玫瑰色镰刀孢霉、奇异长喙壳	
绒毛霉（domny mildew）	葡萄生单轴霉、盘根霉	葡萄
干烂（dry rot）	镰刀孢霉	土豆
灰色霉斑	灰色葡萄孢	葡萄，其它
绿色霉斑	指状青霉	柑橘
皮孔腐烂	*Cryptosporiopsis malicorticis*	苹果，梨
	Phyllactaena vagabunda	
菠萝黑色腐烂（斑）	奇异串珠根霉	菠萝
疫霉腐烂	*Colletotrichum coccodes*	蔬菜
粉红色霉斑	玫瑰单端孢	
根霉软腐	葡枝根霉	甘薯，土豆
发黏棕色腐烂	丝核菌	蔬菜
黑色霉菌斑	黑曲霉	梨，杏
酸烂	白地霉	土豆，柑橘
茎端腐烂	柑橘拟茎点霉、蒂腐色二孢、柑橘交链孢霉	柑橘
水样软腐病	洋葱核盘孢	胡萝卜

灰霉腐烂：它是由灰霉葡萄孢子引起的，这类孢子萌发可形成灰色的菌丝体。高湿和暖和的环境有利于这类腐败的发生。易受此病害影响的蔬菜包括：芦笋、洋葱、大蒜、豆类（青刀豆、利马豆荚、白刀豆）、胡萝卜、防风草、芹菜、西红柿、菊苣、球蓟、茵芭、大黄根、卷心菜、比京芽菜、花菜、硬花甘蓝、红萝卜、芜菁甘蓝、大头菜、黄瓜、南瓜、胡椒和甜土豆。在这种病害中，致病真菌主要以灰霉形式存在于果蔬腐烂的部位。

它可以通过果蔬未破损的表皮或通过切口和裂缝处进入果蔬中。

酸烂（卵孢霉腐烂，出水状软腐）：它是由白地霉或其它真菌引起的。易受此病害影响的蔬菜包括：芦笋、洋葱、大蒜、豆类（青刀豆、利马豆荚、白刀豆）、胡萝卜、防风草、皱叶欧芹、菊苣、球蓟、莴苣、卷心菜、比京芽菜、花菜、硬花甘蓝、红萝卜、芜菁甘蓝、大头菜和西红柿。真菌致病体广泛分布于土壤和腐败变质的水果和蔬菜中。黄

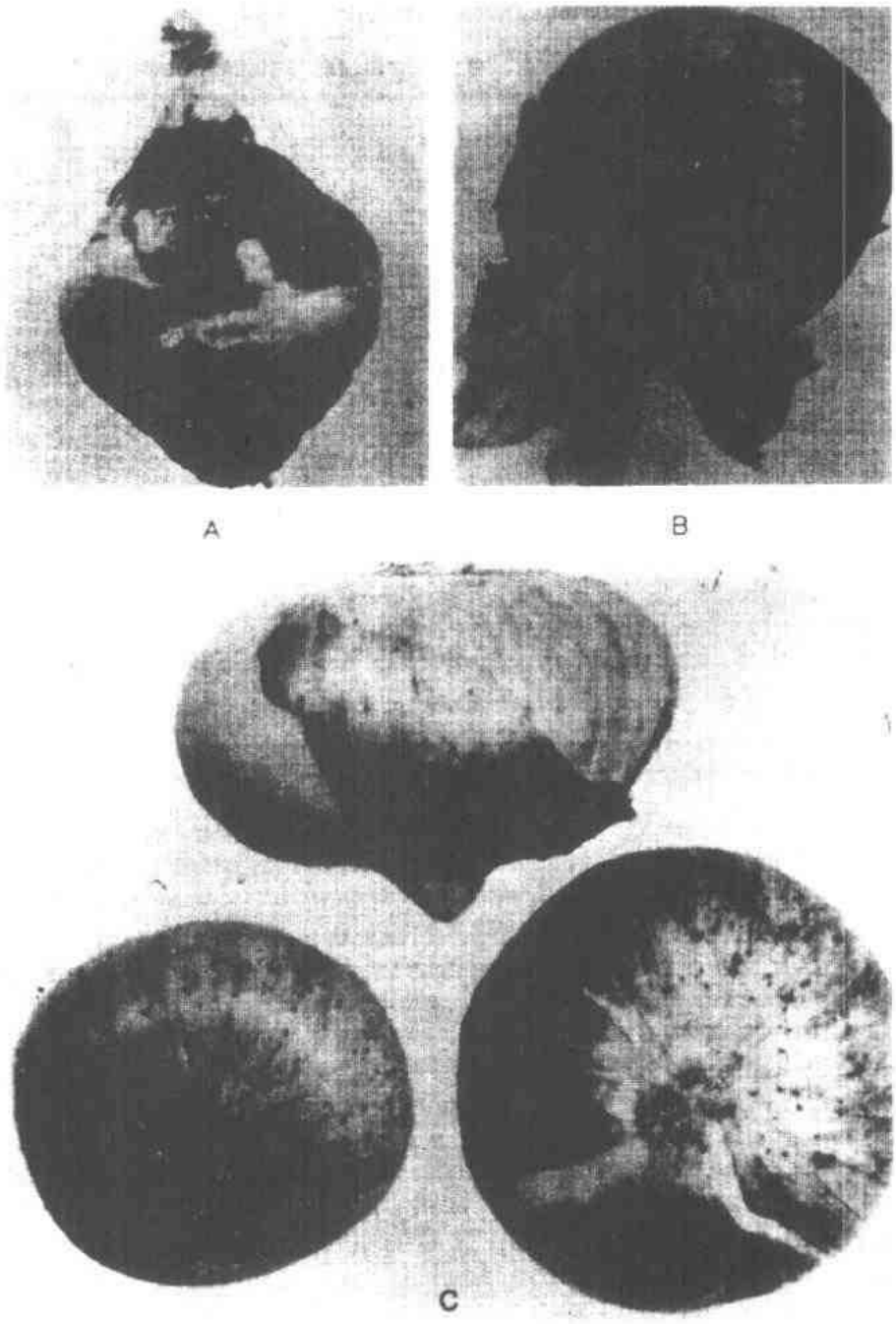


图 8.3　洋葱病害（摘自农业手册第 303 页，美国农业部，1966，第 5 章）
A—白色斑病　B—黑霉斑病　C—色二孢属菌斑

猩猩果蝇利用它们的身体将存在于腐烂水果、蔬菜上的霉菌孢子和菌丝体传至健康水果和蔬菜的生长裂缝和受损处。这种真菌不能进入没有受损的表面，因此，感染通常从破损的个体开始[54]。

根霉软腐：此病害是由葡枝根霉菌和其它能使蔬菜变软和发黏的霉菌引起的。棉花状生长霉菌其孢囊的小黑点通常覆盖在蔬菜表面。受这些影响的有豆类（豆荚，利马豆荚，白刀豆），胡萝卜，番薯，马铃薯，卷心菜，苔蓝，花菜，椰菜，萝卜，芜菁，黄瓜，香瓜，南瓜，西瓜和西红柿。这些真菌通过在各种果蔬的裂缝上产卵的黄猩猩果蝇传播，这些真菌也通过其它方法广泛传播和扩散，通常真菌入侵果蔬的伤口和其它表皮裂缝。

疫霉腐烂：这种病害，是发生于市场销售时由疫霉属菌引起的，它造成大量上市蔬菜枯萎和水果腐烂。这似乎比某些其它市场“疾病”更难控制，并且它们对不同的作物的影响方式不同。易受此病害侵蚀的果蔬有芦笋、洋葱、大蒜、甜瓜、西瓜、西红柿、茄子和胡椒等。

炭疽病：这种植物病害的特征是蔬菜叶子、水果或种子荚出现斑点。它是由 *colletotrichum coccodes* 和其它菌引起的。这些真菌被认为是弱的病原体。它们四季生长在腐烂植物残骸和诸如西红柿等不同植物的种子表面。温暖和潮湿的气候有利于其传播。易受此病害侵蚀的有：豆类、黄瓜、西瓜、南瓜藤、南瓜、西红柿和胡椒。

有关果蔬市场疾病的更详细资料，可参考由美国农业部农业研究服务中心出版的有关专著（参见图 8.3 洋葱的几种真菌病害）和参考文献[30,58]。

8.2 水果的腐烂

表 8.7 为 18 种常见水果的总成分含量，其平均含水量约 85%，比蔬菜稍少；碳水化合物平均含量约 13%，比蔬菜稍多。水果的蛋白质、脂肪和灰分的平均含量分别为 0.9%、0.5%和 0.5%，除灰分含量外，其余两项均比蔬菜的低，水果中维生素和其它有机物的含量与蔬菜相当。因此就营养成分而言，水果可为细菌、酵母和霉菌的生长提供条件，然而，水果的 pH 低于有利于细菌生长的 pH。单这一事实就足以解释水果在最初腐烂时为什么通常没有细菌存在。霉菌和酵母生长的 pH 范围较宽，因此可造成水果的腐烂。除了梨在腐烂的初期可能受到欧氏植病杆菌侵袭外，在水果的腐烂初期，细菌所造成的影响是有限的。至于为什么 pH3.8～4.6 的梨会遭受这种菌的腐烂作用，其机理还不清楚。欧氏植病杆菌最初在水果表面生长，所以可推测水果内部的 pH 比其表面要低。

不同的酵母通常可在水果表面被检出，这些菌通常引起水果产品的腐烂，特别是在野外。许多酵母能够利用水果的糖使其发酵，产生乙醇和 CO_2。由于酵母的生长速率通常比霉菌快，某些情况下，在水果腐烂时，酵母要先于霉菌存在。还不清楚霉菌的生长是否取决于酵母在果蔬腐烂过程中的最初反应。霉菌比酵母能更多地利用或降解高分子质量的组分。许多霉菌能利用乙醇作能源，当乙醇和其它简单化合物耗尽后，这些菌加速破坏水果的剩余部分，如结构多糖和果皮。

表 8.7　　常见水果的一般化学成分[77]　　单位：%

水　果	水分	碳水化合物	蛋白质	脂　肪	灰　分
苹果	84.1	14.9	0.3	0.3	0.4
杏	85.4	12.9	1.0	0.6	0.1
香蕉	74.8	23.0	1.2	0.8	0.2
黑莓	84.8	12.5	1.2	0.5	1.0
樱桃（甜或酸）	83.0	14.8	1.1	0.6	0.5
无花果	78.0	19.6	1.4	0.6	0.4
柚子	88.8	10.1	0.5	0.4	0.2
柚子（美国）	81.9	14.9	1.4	0.4	1.4
柠檬	89.3	8.9	0.9	0.5	0.6
酸橙	86.3	12.3	0.8	0.8	0.1
橙子	87.2	11.2	0.9	0.5	0.2
桃子	86.9	12.0	0.5	0.5	0.1
梨子	82.7	15.8	0.7	0.4	0.4
菠萝	85.3	13.7	0.4	0.4	0.2
李子	85.7	12.9	0.7	0.5	0.2
悬钩子	80.6	15.7	1.5	0.6	1.6
大黄	94.4	3.8	0.5	0.7	0.1
草莓	89.9	8.3	0.8	0.5	0.5
平均	84.9	13.2	0.88	0.53	0.46

注：摘自 Watt and Merrill[77]。

8.3　发酵产品

8.3.1　面包

旧金山酵头面包与其它各国的酵母面包相似。历史上，酵头面包的发酵剂是由面包酵头中的自然菌相构成的（酵头发酵或母面团，即留一定比例发酵过的面团，保存后作为下一批的发酵剂）。发酵剂一般是酵母和乳酸菌的混合物。至于旧金山发酵面包，其酵母已被证实为微小糖酵母（一种假丝菌母），相应的细菌为旧金山乳酸杆菌、发酵乳酸杆菌、食果糖乳酸杆菌、一些短小乳杆菌以及新命名的 *L. Pontis*[76]。面团的酸性是由这些细菌产酸引起的。尽管一些细菌也产生 CO_2，但发酵作用的主体是酵母。这些酵母面团的 pH 在 3.8～4.5 之间，发酵产生乙酸和乳酸，乙酸占总酸度的 20%～30%。

Idli 是一种常见于印度南部的发酵面包型产品，由大米和印度黑绿豆制成。将这两种配料分别在水中浸泡 3～10h，然后取出按不同比例粉碎，混合，发酵过夜。发酵隆起的产品用蒸气蒸熟、热食。据说该产品类似于一种蒸熟的面包[65]。发酵过程中，pH 由起始的 6.0 左右降至 4.3～5.3。在一特定的研究中，pH4.70 的面粉糊状物经 20h 发酵后，其乳酸含量占干物重的 2.5%[34]。在对 Idli 的研究中，Steinkraus 等人[65]发现：经过 20～

22h 发酵后，细菌总数为 10^8～10^9/g。大多数菌是革兰氏阳性球菌或短杆菌，而其中肠膜状明串珠菌又是数量最多的菌种，其次是粪肠球菌。Idli 的发酵作用是由肠膜状明串珠菌引起的，这是乳酸菌在自然发酵面包中有此作用的惟一已知的实例[34]。后面一位作者证实：黑绿豆是一种比大米更重要的乳酸菌来源。肠膜状明串珠菌在 24h 左右达到其生长高峰，而粪肠球菌则在 20h 后才开始作用。其它可能参与发酵的菌包括德氏乳杆菌、发酵乳杆菌和芽孢杆菌属细菌[55]。在 Idli 发酵 30h 以后，啤酒片球菌（*p. cerevisiae*）才开始作用。这种产品的发酵时间一般不超过 24h，因为此时已达到发酵的最高峰，并且随着发酵时间的延长，发酵作用反而降低。如果 Idli 发酵更长时间，则会产生更多的酸。实验结果表明：总酸（用 g 乳酸/g 干基表示）可由 24h 发酵结束时的 2.71%增加到发酵 71h 的 3.70%，与此同时，pH 从 4.55 降至 4.10[34]。Reddy 等人已对有关 Idli 发酵的内容做了综述，可见参考文献[50]。

8.3.2 橄榄、腌菜和泡菜

橄榄的发酵（西班牙，希腊，意大利西西里岛）是通过绿橄榄中存在的自然菌群实现的。它由各种细菌、酵母和霉菌组成。橄榄发酵过程除了速度较慢以外，与泡菜发酵很相似，包括碱处理和可能需要的添加发酵剂等过程。在发酵的中间阶段，乳酸菌成为主导菌。肠膜状明串珠菌和啤酒片球菌是最先成为主导菌的菌种，接着的是乳酸杆菌。而其中植物乳杆菌和短乳杆菌又最为重要[72]。

橄榄发酵的过程是：先根据橄榄的种类，将绿橄榄用 1.6%～2.0%碱液处理，处理温度 21～25℃、时间 4～7h，以除去大部分苦味物质。然后进行浸泡、漂洗以完全除去碱液。然后将绿橄榄置于橡木桶内进行盐腌，盐度维持恒定在 28°～30°。因为碱处理过程中杀灭了菌体，因此需要接种植物乳杆菌。发酵需进行 6～10 个月，最终产品 pH 为3.8～4.0，相当于含 1%的乳酸。

在橄榄遭受的微生物腐烂中，最具特征之一的是产酸产硫化氢的变黑腐败。这种腐败有时发生在盐渍橄榄中，其特征是有恶臭。很明显，臭味源于丙酸杆菌属中某些菌产生的丙酸[25]。

西班牙型绿橄榄变软是由黏红酵母黏红变种（*Rhodotorula glutinis var. glutinis*），微小红酵母微小变种（*R. minuta var. minuta*）和深红酵母（*R. rubra*）引起的[73]。所有这些酵母都可分泌聚半乳糖醛酸酶，而导致橄榄组织的变软。在适宜的条件下，上述各菌可产生甲基果胶酯酶以及多聚半乳糖醛酸酶。

Patel 和 Vaughn[41]证实：美国加利福尼亚州成熟橄榄遭受的是脱皮型(sloughing)腐烂。它是由产黄纤维单胞菌（*cellulomonas flavigenarh*）引起的。这种菌具有高的水解细胞活性，其它菌，例如肠细菌、埃希氏肠杆菌和黄单胞菌（*Xanthomonas*）的生长，会使其活性得以进一步的提高。

酸黄瓜是鲜黄瓜的发酵产品，也是泡菜产品，其发酵剂通常是由正常存在于黄瓜中的混合菌种组成的。在天然的酸黄瓜产品中，参与发酵作用的乳酸菌主要有肠膜状明串珠菌、粪肠杆菌、啤酒片球菌、短乳杆菌和植物乳杆菌[46]。其中片球菌和植物乳杆菌的含量为最多，短乳杆菌因为产气而不受欢迎。同泡菜一样，植物乳杆菌是酸黄瓜产品中

最基本的菌种。

制作酸黄瓜时，将挑选的黄瓜置于木制容器内进行盐腌。初始盐腌浓度为 5%NaCl（盐度为 20°）。在发酵 6～9 周后盐腌强度逐渐增加，直至盐度达到约为 60°（15.9% NaCl）。其目的除了抑制革兰氏阴性菌外，还可将黄瓜中水及水溶性物质，例如糖，从黄瓜中渗出。而糖通过乳酸菌转化为乳酸。含盐的腌渍制品如酸菜、酱菜、中国什锦菜等等，都可如法炮制。

生产腌制菜的传统技术已沿用了许多年，但因胀罐、变软、变色等腌菜腐烂现象的产生，经常造成严重的经济损失。用发酵法大批量生产酸黄瓜的工艺已开发成功。这种工艺不但降低了经济损失，而且可使产品质量更为一致，生产周期也大大缩短[46]。腌菜的控制发酵生产工艺，采用盐度 25°的氯处理盐水，用乙酸酸化，并加入乙酸钠，用啤酒片球菌和植物乳杆菌或后者单独进行接种。图 8.4 表示的是 10～12d 的发酵过程中各工艺参数的变化情况[46]。

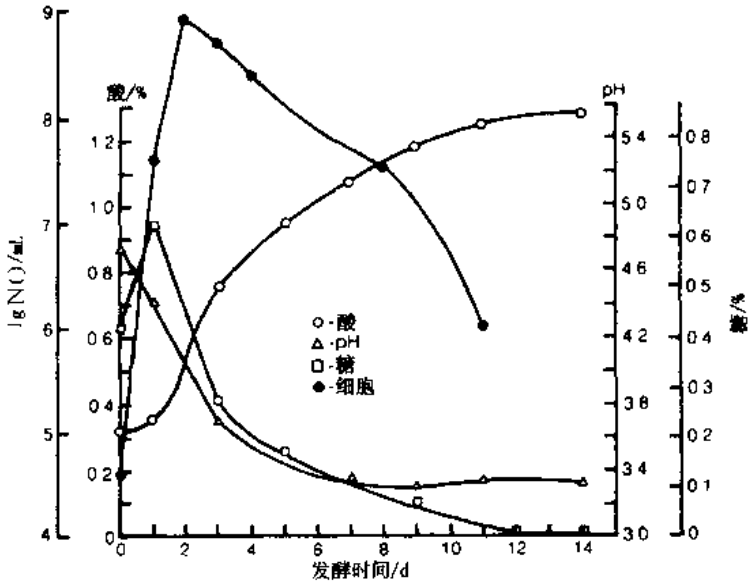


图 8.4　工业化生产酸黄瓜的发酵过程[16]

（摘自 Etchells et al.[15]，版权 1975 学院快报）

注：发酵过程中平衡盐浓度为 6.4%NaCl，培养温度 27℃。

产品最终 pH 约为 4.0，细菌和霉菌可使腌菜发生腐烂。腌菜变黑可能是由致黑芽孢杆菌引起的，它产生黑色的水溶性色素。众所周知“胀罐”是由肠细菌属、乳杆菌属、片球菌在各个腌制产品中产气引起的。芽孢杆菌、镰刀孢霉菌、青霉菌、茎点霉菌（*Phoma*）、芽枝霉、变链孢霉、毛霉、曲霉等具有果胶分解能力的其它菌会引起腌菜的软化。事实上，腌菜软化也可能由一种或多种与此有关的微生物引起。腌制软化是果胶酶作用的结果，果胶酶能分解产品细胞壁中的胶性物质。

泡菜是新鲜卷心菜发酵后的产品。泡菜制作的发酵剂是卷心菜中自然存在的混合菌群。当含盐量达 2.25%～2.5%时，可以抑制革兰阴性菌的生长，但对乳酸杆菌和乳酸球

菌的生长却是有利的。在泡菜生产中，肠膜状明串珠菌和植物乳杆菌是两种最适合的乳酸菌，前者的代时较短，个体生命也更强。当酸度提高到0.7%～1.0%时，球菌通常会失去活性。泡菜生产的最后阶段受植物乳杆菌和短乳杆菌的作用。啤酒片球菌和粪肠球菌对产品的制作也有作用。在发酵末期，酸度通常达1.6%～1.8%，表示为乳酸含量为1.0%～1.3%，pH在3.1～3.7之间。

因微生物引起的泡菜腐败现象通常可分为以下几种：泡菜变软、发黏、腐烂、变红。泡菜变软是因为那些本应在泡菜生产后期生长的细菌提前生长引起的。泡菜发黏是黄瓜乳酸杆菌和植物乳杆菌快速生长引起的，尤其是在温度较高时[46]。泡菜腐烂可能是由细菌、霉菌和（或）酵母菌引起的。而泡菜发红是由于圆酵母属，尤其是*T. glutinis*在其表面生长而造成的。由于高酸性，泡菜表面通常会发生由霉菌引起的腐败。这些菌的生长会导致pH的上升，使大量原本由于高酸性而受抑制的细菌得以生长。

8.3.3 啤酒、麦酒、葡萄酒、苹果酒和威士忌酒

啤酒和麦酒是酿造的麦芽饮料，酿造过程中一个基本的步骤是将碳水化合物发酵成乙醇。因用来发酵的大多数谷物中的碳水化合物都以淀粉形式存在，而用于发酵的酵母不产生降解淀粉的淀粉酶，所以，啤酒酿造过程中必须先提供麦芽或其它外源性淀粉酶把淀粉水解成可被酵母利用的糖类。首先使大麦发芽以制成麦芽作为淀粉酶的来源（也可利用真菌淀粉酶），包括β-淀粉酶和α-淀粉酶。α-淀粉酶用来液化淀粉，β-淀粉酶则可增加糖的形成。简言之，将麦芽、麦芽辅料、啤酒花和水混合时酿造就开始了。麦芽辅料包括某些谷物、谷物产品、糖和其它可用作发酵底物的碳水化合物。加入啤酒花作为焦棓酚、儿茶酚单宁、树脂、香精油和其它组分的来源，用以在煮沸麦芽汁时沉淀不稳定的蛋白质并提供生物稳定性、苦味和芬芳风味。将麦芽和麦芽辅料溶解、加热以及淀粉水解的过程称为糖化（mashing）。糖化物的溶解部分被称为麦芽汁。在某些酿造厂里，糖化过程中引入乳杆菌以通过产生乳酸来降低麦芽汁的pH，通常用于这种目的菌种是德氏乳杆菌[24]。

接着将麦芽汁和啤酒花混合，煮沸1.5～2.5h，其目的有：以使酶失活、提取可溶性啤酒花物质、沉淀凝固的蛋白质、浓缩及杀菌。麦芽和啤酒花煮沸过程结束后即可进行麦芽汁的分离、冷却和发酵。在富含糖源的麦芽汁中接种啤酒酵母即可进行发酵。上层发酵酵母进行的发酵可将啤酒的pH降至3.8左右，而底部发酵酵母（卡尔斯伯糖酵母）可使淡啤（lager）及其它啤酒的pH达4.1～4.2。上层发酵可在5～7d内完成，而底部发酵则需7～12d[46]。发酵完成的啤酒在销售前要经过老化以及充入CO_2工序，CO_2最后浓度要达到0.45%～0.52%。啤酒的巴氏灭菌温度为60℃或60℃以上，其目的是杀灭腐败菌。当啤酒中存在乳酸菌时，上层发酵啤酒中最有可能存在的是乳杆菌，而底部发酵啤酒中经常检出的是片球菌[24]。

啤酒和麦酒的工业酸败通常指啤酒被污染。这种状况是由酵母和细菌引起，啤酒和麦酒的酸败类型可分为四类：发黏、八叠球菌属变质（*sarcinae sickness*）、发酸及混浊。发黏是指啤酒变黏倒出来像“油”的状况，它是由醋酸杆菌、乳杆菌、啤酒片球菌和氧化葡萄糖杆菌（以前称醋单胞细菌）[16,78]。八叠球菌属变质是由啤酒片球菌引起的，它产生

类似蜂蜜的气味。这种特征性气味是由酸败微生物产生的丁二酮和普通啤酒的气味共同作用的结果。啤酒发酸是由醋酸杆菌属菌引起的。这些微生物能把乙醇氧化为乙酸，乙酸水平的增加导致啤酒发酸。啤酒的混浊和变味是由灭氧发酵单胞菌（*Zymoonas anaerobia*）（以前称 *Achromobacter anaerobnum*）和一些酵母例如糖酵母菌引起。由于啤酒的正常 pH 范围为 4～5，且含很好的可利用的营养成分，因此在啤酒中细菌生长是可能的。

在变质啤酒和种酵母中可以分离得到一些革兰氏阴性专性厌氧菌，主要是 4 个属中的 6 种菌：

啤酒巨球形菌（*Megasphaera cerevisiae*）	*Selenomonas Lacticifex*
Pectinatus cerevisiiphilus	*Zymophilus Paucivorans*
P. frisingensis	*Z. raffinosivorans*

除了啤酒巨球形菌外，上述其它菌都产乙酸和丙酸，*S. Lacticifex* 也可产生乳酸[56]。虽然啤酒巨球形菌只产生很少的乙酸和丙酸，但它除了产生 H_2S 之外，还产生大量的异戊酸[11]。*P. cerevisiiphilus* 是上述 6 种菌中第一个被确认与啤酒变质有关的菌，它是在 1978 年从混浊和变味的啤酒中分离得到的[28]。不但在美国，而且在欧洲其它国家及日本的酿造业中都发现了 *P. cerevisiiphilus* 的存在。作为啤酒腐败菌，这些菌不寻常的特点是它们的革兰氏反应和专性厌氧性质。过去一直认为典型的啤酒腐败菌应是产乳酸细菌或酵母。巨球形菌（*Megasphaera*）和月形单胞菌（*Selenomonas*）已确认为瘤胃菌群的成员。

对于包装啤酒的变质，其主要污染菌是糖化糖酵母（*S. diastatius*），它能利用普通酿造酵母不能利用的糊精[24]。在变质的啤酒中有时也可检测出片球菌、变形黄杆菌和酒香酵母菌。

葡萄酒是由完好的葡萄经酒精发酵和陈熟等工艺制成的。葡萄酒也可采用诸如桃子、梨等其它水果经发酵后制成，但在这些情况下葡萄酒通常按其制作水果的名字命名，例如梨酒、桃子酒等等。因为水果包含有可发酵的糖源，所以就没有必要使用外源性的淀粉酶，这点与用谷物生产啤酒和威士忌有些不同。葡萄酒生产的第一步是对葡萄的挑选，然后进行压榨和用亚硫酸盐如亚硫酸氢钾进行处理，后者的目的是抑制乙酸菌、野生酵母及霉菌的生长。经过压榨的果汁，称为葡萄汁。接入葡萄汁中的菌种为椭圆形糖酵母（葡萄酒酵母）菌株。发酵的温度是 21～32 C，发酵时间 3～5d，对良种酵母产乙醇量可达 14%～18%[143]。发酵后进行“烧酒”，即将酒汁从发酵残渣或沉淀中压出；在残渣和沉淀中含有酒石酸氢钾。在贮存和陈化过程中酒会发生自然澄清并形成特有的风味。红葡萄酒是将打烂的带皮葡萄进行发酵制成的，在此过程中皮色素可被抽提至酒中。白葡萄酒通常是由白葡萄汁制作而成的。香槟酒是由葡萄酒经第二次发酵制成的。生产过程中将糖、柠檬和香槟酵母发酵剂加至预先准备好的佐餐葡萄酒酒瓶中。加软木塞、夹紧瓶盖，在要求的温度下水平放置贮存约 6 个月。然后拿出，搅动并进行长达 4 年的陈化。将酒的温度降至 25 C 左右，并维持 1～2 星期可以加速酵母细胞和酒石酸钾的沉淀。有关更详细的香槟酒生产和分类方式可参见 Prescott 和 Dunn[46] 的参考文献。

细菌和酵母会导致佐餐葡萄酒的变质腐败，而这其中有效假丝酵母又是最重要的一种。这些菌在葡萄酒表面生长，并形成一层菌膜。这层菌利用乙醇和其它成分并有时产生称为酒花（wine flowers）的现象。导致葡萄酒变质的细菌是一些醋酸杆菌属菌，它们

氧化乙醇产生乙酸（产醋）。佐餐葡萄酒最严重和最常见的问题恐怕就是葡萄酒的混浊现象。这种现象是由一些能利用糖，并且适宜于低酒精浓度下生长的兼性厌氧或厌氧菌引起的。这种变质的特征是挥发性酸的增加、丝状的混浊，并在腐败后期产生酸败气味。

葡萄酒最为严重的腐败是苹果酸-乳酸发酵作用。在葡萄汁和葡萄酒中，苹果酸和酒石酸是二种最主要的有机酸。在苹果酸-乳酸发酵过程中，污染的细菌将苹果酸分解为乳酸和 CO_2：

$$\text{L（-）-苹果酸} \xrightarrow{\text{苹果酸-乳酸酶}} \text{L（-）-乳酸} + CO_2$$

L-苹果酸也可经脱羧反应形成丙酮酸[26]。这些变化的结果导致酸度的降低并影响酒的风味。许多乳酸菌可发生苹果酸-乳酸发酵（也可在苹果汁中进行），这其中包括明串珠菌、片球菌和乳酸杆菌。虽然苹果酸-乳酸发酵对发酵微生物的作用还不是很清楚，但这一过程确实可以刺激 *O. oeni* 的生长[14]。酒石酸在葡萄酒中的分解也是不希望的，一些植物乳酸杆菌的菌株可以通过下列方式分解酒石酸：

$$\text{酒石酸} \longrightarrow \text{乳酸} + \text{乙酸} + CO_2$$

反应结果使酒的酸度降低。与苹果酸-乳酸发酵作用不同，极少的乳酸菌可以降解酒石酸。

O. oeni 是一种能生长在 pH 为 3.5～3.8 之间的葡萄汁和葡萄酒中的嗜酸菌，其最初生长 pH 为 2.8[12]。可以在 10% 乙醇存在的情况下生长，但此时需要一些存在于葡萄或西红柿汁中的特殊生长因子。

在美国，苹果酒是一种由苹果汁经自然生长酵母进行轻度发酵而制成的一种产品。在制作过程中，先经选果、清洗并压榨成浆。乳酪状浆体经压滤得到果汁。果汁过滤后放入贮存容器中，在温度保持在 4.4℃或更低的情况下，通常经过 12～36h 或几天的静置，果汁中的颗粒物就会沉淀下来。澄清后的汁液即为苹果酒。如需要进行巴氏杀菌，杀菌条件可定为 48.9℃、10min。生产中最常用的化学防腐剂是山梨酸钾，使用浓度为 0.10%。也可采用冷冻或冷藏方式进行保藏。产品中除了乙醛外还含少量的乙醇。在适宜的恒温下，未经巴氏杀菌或未加防腐措施的苹果酒在保存一段时间后会有醋味产生，这是由于醋酸杆菌在这些产品中生长造成的。醋酸杆菌的代谢途径可见第三部分 7 中图 7.1F、G。

Passmore 和 Garr[39]在对苹果酒生产中醋酸杆菌的生态学研究中发现了 6 种醋酸杆菌，并发现在苹果酒生产初期检出的醋酸杆菌大多是嗜糖的，而当酵母将大多数糖转化为乙醇后，存在的醋酸杆菌具更高的耐酸性和氧化乙醇的能力。从苹果酒中也分离得到了发酵葡萄糖为乙醇的发酵单胞菌及革兰氏阴性菌，但据推测它们的含菌量较低。近年来发现的 *Saccharohaeter fermentatus* 菌在发酵葡萄糖产生乙醇和 CO_2 性质方面与发酵单胞菌相似[79]。这种菌是从龙舌兰叶中分离得到的，但是有关它在变质苹果酒中的存在及作用还有待于进一步确定。其它产乙醇的细菌可在发酵单胞菌属中找到。

蒸馏酒实质是一种酒精产品，它是对酵母在谷物、谷类制品、糖蜜、水果或果品中的发酵产物进行蒸馏而制成的。威士忌、杜松子酒、伏特加酒、朗姆酒、甜酒和利口酒都属于蒸馏酒。虽然生产大多数这类酒的生产过程与啤酒的相似，但其成品中酒精的含量却要比啤酒高得多。黑麦威士忌和“borubon”威士忌也是威士忌产品的成员。前者生产中，原料是由黑麦和黑麦芽或黑麦和大麦麦芽按一定比例配置而成的，但按规定黑麦

的比例要超过 51%；而“borubon”酒的原料是由玉米、大麦麦芽或小麦麦芽，及第三种谷物按一定比例配置而成，但按规定玉米的比例不得低于 51%。酸麦芽汁的制备是为了抑制其它一些不必要菌的生长，酸性可自然产生也可通过加酸实现。糖化醪的酸化是通过接入同型发酵的乳酸菌（例德氏乳杆菌）实现的。该菌具有在 6～10h 内将发酵介质 pH 降低至约 3.8 的能力[42]。麦芽酶（糖化酶）将熟谷物中的淀粉转化为糊精和糖，在完成糖化作用和产生乳酸后，对糖化醪进行加热以杀灭所有菌种。然后将其冷却至 24～27℃，并接入所选的啤酒酵母菌株进行发酵生成乙醇。发酵完成后的液体进行蒸馏得到乙醇和其它挥发性成分，按要求的特定条件进行各种处理和贮存后即可制成各类产品。苏格兰威士忌的主要原料是大麦，所用的大麦麦芽要先在有泥灰的窑内进行烘干；朗姆酒是对糖蔗或糖蜜的发酵物通过蒸馏制成的；而白兰地酒是对葡萄酒或其它果酒进行蒸馏制成的。

棕榈酒或尼日利亚棕榈酒是一种热带地区饮用的酒精饮料，它是由棕榈树树液经自然发酵制成的。这种树液味甜、呈深棕色，并含 10%～12%的糖分，且大多为蔗糖。发酵后的树液由于含大量的发酵细菌和酵母使其变为乳白色。这种酒的特别之处在于饮用时仍含有活菌。Faparusi 和 Bassir[36]及 okafor[37]对这种发酵作用进行了综述和研究，并且发现在成品中最主要的细菌是：小球菌、明串珠菌、链球菌、乳酸杆菌和醋酸杆菌；而最主要的酵母菌是：酵母属和假丝酵母属菌，而前者更为常见[36]。在 36～48h 的发酵过程中，树液的 pH 从 7.0 或 7.2 降至小于 4.5。发酵产物中除了乙醇外还含有有机酸。在发酵前期，首先是赛氏杆菌和肠细菌数量的增加，接着乳酸杆菌和明串珠菌的数量开始增加，发酵 48h 后才可检出醋酸杆菌[16,38]。

沙淇酒（sake）也是一种乙醇饮料，通常产于日本。其发酵底物是来自于蒸熟大米中的淀粉，通过米曲霉将淀粉水解为糖以制成日本酒曲（koji）。发酵用菌种是沙淇酵母，发酵时间为 30～40d。发酵产物含 12%～15%的乙醇和大约 0.3%的乳酸[42]。乳酸是由同型和异型发酵乳杆菌产生的。有关这种类型的发酵产品列于表 8.8。

表 8.8　　各种发酵产品概述

产　品	发酵底物	发酵菌	产地
非饮料型植物产品			
Bongkrek	椰子滤饼	寡孢根霉	印度尼西亚
可可豆	可可果（豆荚）	克鲁斯氏假丝酵母、地霉	非洲、南美洲
咖啡豆	咖啡果	溶解欧氏植病杆菌和酵母	巴西、刚果、印度、美国夏威夷
Gari	木薯粉	毛盘孢霉属和地霉	西非
Kenkey	玉米	曲霉、青霉属菌、乳酸杆菌、酵母	加纳、尼日利亚
朝鲜泡酸菜	卷心菜及其它蔬菜	乳酸菌	韩国
日本豆面酱	大豆	米曲霉、鲁氏接合酵母	日本
Ogi	玉米	植物乳杆菌、乳酸乳球菌、鲁氏接合酵母	尼日利亚
橄榄	青橄榄	肠膜状明串珠菌、植物乳杆菌	世界各地
Ontjom	花生	好食链孢霉	印度尼西亚

续表

产　品	发酵底物	发酵菌	产地
非饮料型植物产品			
Peujeum	木薯	霉菌	印度尼西亚
腌菜	黄瓜	啤酒片球菌、植物乳杆菌	世界各地
Poi	芋根	乳酸菌	美国夏威夷
泡菜	卷心菜	肠膜状明串珠菌、植物乳杆菌	世界各地
豆酱	大豆	米曲霉、德氏乳杆菌、鲁氏接合酵母	日本
Sufu	大豆	毛霉属菌	中国
Tao-si	大豆	米曲霉	菲律宾
Tempeh	大豆	寡孢根霉、米根霉	印度尼西亚、新几内亚、苏里南
饮料类及相关产品			
阿拉克酒	大米	酵母、细菌	远东
啤酒和麦酒	麦芽汁	啤酒酵母	全世界
Binuburan	大米	酵母	菲律宾
Bourban 威士忌	玉米、黑麦	啤酒酵母	美国
Bouza 啤酒	小麦	酵母	埃及
苹果酒	苹果、其它	啤酒酵母	全世界
卡菲尔啤酒	卡菲尔玉米	酵母、霉菌、乳酸菌	马拉维
Magon	玉米	乳酸杆菌属菌	南非班图族
Mezcal	植物	酵母	墨西哥
Oo	大米	酵母	泰国
Pulque	龙舌兰汁	酵母和乳酸菌	墨西哥、美国西南部
沙淇酒	大米	沙淇酵母	日本
苏格兰威士忌	大麦	啤酒酵母	苏格兰
Teekwass	茶叶	木质醋杆菌、粟酒裂殖酵母	
Yhumba	小米	*Endomycopsis fibuliges*	西孟加拉湾
Tibi	无花果干、葡萄干	*Betabacterium vermiforme*、中间型酵母	
醋	苹果汁、葡萄酒	醋酸杆菌	全世界
葡萄酒	葡萄及其它水果	葡萄酒酵母菌株	全世界
棕榈酒	棕榈树液	醋酸杆菌、乳酸菌、酵母	尼日利亚
面包类			
Idli	米和豆粉	肠膜状明串珠菌	印度南部
面卷、糕点等	面粉	啤酒酵母	全世界
旧金山酵头面包	面粉	微小糖酵母、旧金山乳杆菌	美国加利福尼亚
粗黑麦面包	面粉	肠膜状明串珠菌	瑞士、其它地区

8.4 各类发酵制品

8.4.1 咖啡豆

未经处理的咖啡果外部有分泌黏液的果肉外层，在咖啡豆干燥和焙炒前必须将此层除去。湿法去除该层最有利于产品的生产，它包括去果肉、去黏液及干燥。去果肉可采用机械进行，而去黏液则是通过自然发酵完成的。黏液层是由大量的果胶物质组成的[18]，在它们的去除过程中，分解果胶的微生物发挥了重要的作用。虽然 Pederson 和 Breed[43] 认为墨西哥和哥伦比亚的咖啡浆果的发酵是由典型的乳酸菌（明串珠菌和乳酸杆菌）完成的，但在夏威夷[19]和刚果咖啡浆果[68]的去黏液发酵作用中最重要的作用菌是欧氏植病杆菌。Agate 和 Bhat[1] 在对来自印度 Mysore 州的咖啡果的研究中发现：下列具果胶分解能力的酵母在黏液层的分解和去除过程中起主要作用，它们是马克氏糖酵母、巴杨氏酵母、葡萄酒酵母和裂殖酵母属酵母。霉菌普遍存在于绿咖啡豆中，在一项研究中，来自 31 个国家的绿咖啡豆中 99.1% 含有该类微生物，而且通常存在于豆的表面[82]。其菌相中，7 种曲霉占主导地位，而其中棕曲霉又是未经杀菌的咖啡豆表面最频繁检出的霉菌，其次是黑曲霉和灰绿曲霉中的菌。产毒的黄曲霉和杂色曲霉（*A. versicolor*）也可与圆弥青霉（*P. cyclopium*）、橘青霉和扩张青霉等一起测出，但总的来说曲霉出现的概率要高于青霉[32]。与在可可豆中的情形不同，咖啡豆中的微生物对咖啡豆的风味和芳香的形成无作用。

8.4.2 可可豆

真实的可可豆 cacao beans（cocoa）是指可可粉，巧克力是其加工后的产品。产自生长在亚洲、非洲、南美洲部分地区的可可作物的果实和豆荚中，是巧克力的基本原料。从果实中取出的可可豆根据其类型和大小成批、成箱、成罐地进行为期 2～12d 不等的发酵。在发酵过程中，产生高温（45～50℃）并形成大量的液体。发酵后的原料通过阳光或空气干燥使其水分减至低于 7.5%，再将豆焙炒以形成巧克力特有的风味和芳香。发酵经过两个阶段：在第一阶段中，酸性果肉（pH 约 3.6）中的糖转化为乙醇；第二阶段，乙醇氧化成乙酸。Camargo 等人[10]对巴西可可豆进行了研究，21℃下发酵的第 1d 其菌相几乎全由酵母组成。而到第 3d，温度已上升至 49℃，酵母的数量已降至不高于总菌量的 10%。发酵 7d 后，其 pH 从 3.9 升至 7.1。大约在第 3d，由于不适宜的生长温度、缺乏可发酵的糖源以及乙醇量的增加，使细菌和酵母的活力中止。虽然高温使醋酸菌的数量有所降低，但并非所有的这些菌都被杀灭。酵母和醋酸细菌是可可豆最重要的发酵菌。在 142 株由 Camargo 等人分离的酵母中，105 株是无孢子的；37 株是产子囊孢子。克鲁斯氏假丝酵母（东方伊氏酵母，一种耐热性酵母）是最常见的种类，在发酵的第 2d 它便成为主导菌。在其菌相的构成中也可发现有众多的白地霉及有效假丝酵母存在，而这两种菌都具分解果胶的能力。另一方面，产于巴西的可可豆经 48h 发酵后，其中乳酸菌的数量远远高于酵母[40]。同型发酵乳酸菌中以 3 个属及 8 个种为多，而异型发酵乳酸菌只有肠膜状

明串珠菌和短乳杆菌两种。乳酸菌的存在被认为与来自该地区可可的酸性有关[49]。单兰氏阴性的运动发酵单孢菌曾被作为发酵剂用于可可豆的发酵，但没有成功。该菌可将糖转化为乙醇，继而产生乙酸。异型发酵乳酸菌和醋酸杆菌也参与发酵过程[52]。

虽然在可可豆的发酵过程中，酵母对乙醇的产生起重要的作用，但是酵母对焙炒后可可豆最终形成具有诱人的巧克力风味更具重要意义。Levanon 和 Rossetini[27]发现，酵母自溶释放出的胞内酶对巧克力风味前体物质的形成有一定的作用。醋酸似乎可使可可豆的外壳对酵母释放的酶有一定的可渗入性。已证实：只有经过焙炒可可豆才能形成巧克力的芳香味，未经发酵的可可豆即使经过焙炒也不能形成特征性的芳香味[53]。还原糖和游离氨基酸也以某种方式参与了巧克力芳香味的形成[54]。

8.4.3 酱油或日本酱油（shoyu）

酱油或日本酱油的生产是经过两个阶段完成的。第一阶段为制曲，将米曲霉或 *A. soyae* 接种于大豆或大豆和面粉的混合物中，进行 3d 的培养。制曲的目的是产生大量可发酵的糖源、多肽及氨基酸。第二阶段，即 moromi，将真菌覆盖（fungal-covered）产品加盐至 18%左右，并在室温下培养，时间至少达 1 年。到时得到的液体即为酱油。在 moromi 阶段培养过程中，乳酸菌，尤其是戴氏乳杆菌和诸如鲁氏接合酵母（*Zygosaccharomyces rousii*）等酵母对曲的水解物进行厌氧发酵。已经证实：在制曲过程中使用米曲霉纯菌和 mouomi 阶段使用戴氏乳杆菌和鲁氏接合酵母纯菌种可以生产出高质的酱油[8]。

8.4.4 Tempeh

Tempeh 是一种大豆发酵制品。虽然有许多种不同的制作方法，但印度尼西亚人制作 Tempeh 的基本方法是：先将大豆浸泡过夜，以除去外皮。去皮后的大豆在沸水中煮大约 30min，再在竹篾上铺开进行冷却及表面的干燥。加入一小块已经发酵过的 Tempeh 作为发酵剂，再用香蕉叶将它们包裹。包裹好的原料在室温下放置 1～2d，在此期间霉菌生长，并将包裹的大豆结成一团像蛋糕一样的东西即 Tempeh。也可采用将按上述方法处理的原料贮存于打孔的塑料袋和管中，在 31℃下发酵 24h 来生产优质的 Tempeh 产品[17]。发酵过程中寡孢根霉是一种合乎要求的菌，尤其是对以面粉为原料制作的 Tempeh。用米曲霉和无根根霉也可制作优质的大豆 Tempeh。在发酵过程中，大豆的 pH 从约 5.0 升至高达 7.5。

8.4.5 豆面酱

豆面酱是一种通常产于日本的发酵豆制品，制作过程中先将日本酒曲（koji）、盐和蒸熟的大豆进行混合或磨碎，接着进行 4～12 个月的发酵。白或甜豆面酱只需 1 星期的发酵，而高质量的黑棕色产品(mame)则需长达 2 年的发酵。在以色列，Illany-Feigenbaum 等人[20]使用脱脂大豆替代全豆生产豆面酱型产品，其发酵时间为约 3 个月。用于这种产品生产中的曲是由米曲霉在玉米、小麦、大麦、小米或燕麦、土豆、甜菜或香蕉上生长制成的，并且作者认为其生产的豆面酱型产品质量要优于日本人制作的豆面酱。由于米曲霉有产生毒性产物的可能性，制曲过程可用寡孢根霉在 25℃下对大米进行 90d 的发酵

来完成。用这种曲制成的产品与用米曲霉制曲的产品相差无几[57]。

8.4.6 Ogi

Ogi 是一种尼日利亚约鲁巴地区的主要的谷物制品，并且是一种首选的天然断奶食品。它的制作通常是先将玉米粒浸于温水中 2～3d，然后进行水磨、并且筛网过滤。筛过的物质使其沉淀、发酵，并用叶子包裹后以湿糕形式进行销售[4]。在玉米的浸泡过程中，棒状杆菌成为主导菌，它的生长似乎可为酵母和乳酸菌的生长提供必须的水解淀粉酶的能力[2]。除了棒状杆菌，与复端孢属、镰刀霉属、曲霉属和青霉属一样，啤酒酵母和植物乳杆菌在传统的 Ogi 发酵中也为主导菌。产生的酸主要为乳酸，它使产品的 pH 降到 3.8 左右。棒状杆菌生长较早，经过 1d 发酵后即停止生长，而乳酸杆菌和酵母则继续生长。近来，一种新的 Ogi 制作工艺已被开发、试验，其产品质量要好于传统产品[3]。采用这种新方法，玉米先经干磨制成玉米粉，加水后进行蒸煮、冷却，然后接入由植物乳杆菌、乳酸乳球菌和鲁氏接合酵母组成的混合发酵剂，在 32℃下进行 28h 的发酵，在此期间玉米的 pH 从 6.1 降至 3.8。这一工艺省去了细菌对淀粉水解的过程。除了缩短了发酵时间，也可降低发酵失败的概率。

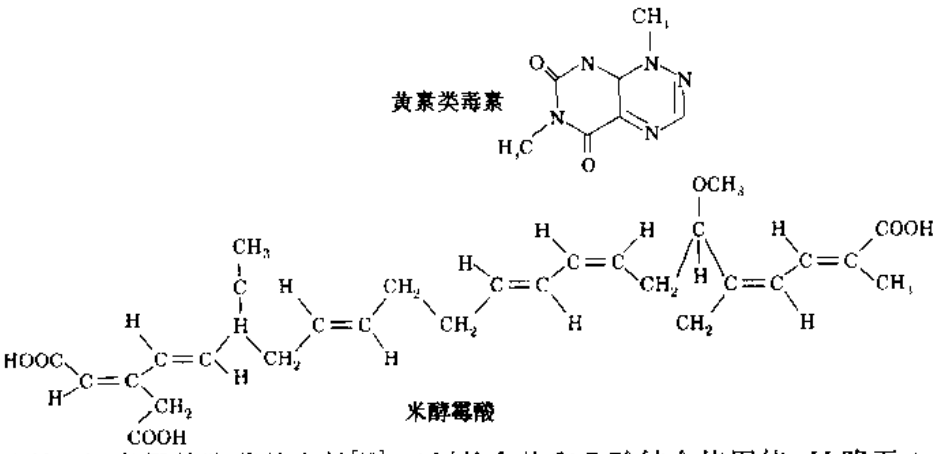
8.4.7 Gari

Gari 是一种产于西非一带，用木薯根制成的食品。木薯根含有氰葡萄糖苷、亚麻苦苷和 Lotaustralin，如果鲜食则会发生中毒。通过加入亚麻苦苷酶可对木薯根进行去毒，它对两种苷都有作用[7]。在制作过程中，通过发酵作用也可使木薯根中的葡萄糖苷分解，产生挥发性氰氢酸而达到去毒的目的。在家庭制作 Gari 过程中，先将木薯根的外皮及表皮去掉，将剩下的磨碎或捣碎。再经压榨去除剩余的汁液，处理好的物料放于袋中发酵 3～4d[51]。产品生产中起主要作用的菌是植物乳杆菌、粪肠球菌和肠膜状明串珠菌[7]。发酵后的产品油炸后即可食用。

8.4.8 Bongkrek

Bongkrek 是一种发酵食品，在过去的几年中已导致多人死亡。Bongkrek 或 Semaji 是印度尼西亚中部一种由椰子压滤饼生产的产品。家庭制作的该产品有可能含有毒成分。用寡孢根霉发酵制成的安全产品是一种表面覆盖有白色真菌的糕状产品。为了使产品生产中要求的菌能良好生长，在培养的第 1d 或第 2d 必须创造使这些真菌能良好生长的条件。如果这段时间里基质条件适宜于细菌的生长，在椰毒假单胞菌（现称为 *Burkhlderia cocovenenans*）存在的情况下，它可以生长，并产生两种有毒物质——黄素类毒素（toxofavin）和米酵霉酸（bongkrekic acid）[70,71,81]。这两种物质有抗真菌和抗细菌性，对人及动物都是有毒的，并且是热稳定性的。该菌在椰子上生长会促进其产生这两类毒素（黄素类毒素可以在复杂的培养基中产生）。这两种抗菌素的结构式见下，黄素类毒素可以作为电子载体，而米酵霉酸则可抑制线粒体上氧化磷酸化反应的进行。

Subik 和 Behun[68]在有关米酵霉酸对阻止孢子发芽及菌丝体生长的研究中证实：米酵霉酸对 17 种霉菌有致死作用。如果原料的 pH 调到低于 5.5，则在 Bongkrek 的制作过



程中就不利于椰毒假单胞菌的生长[60]。2%的食盐和乙酸结合使用使 pH 降至 4.5，可以阻止 Tempeh 中 bonkrek 毒素的形成[47]。

在中国部分地区制作的一种发酵玉米面产品曾由于椰毒假单胞菌的生长而导致食物中毒。这种产品的制作过程是：先在室温下将玉米用水浸泡 2～4 周，接着进行清洗、磨粉以用于各种用途。在室温贮存的过程中，产毒菌在湿的产品上生长，产生米酵霉酸和黄素类毒素，这与 Bongkrek 产品中椰毒假单胞菌生长所造成的结果是相似的。

8.4.9 Ontjom (oncom)

Ontjom (oncom) 在印度尼西亚是一种和 Borgkrek 相似，但又比它更为流行的发酵产品，它的基本制作原料是花生压滤饼，而后者是花生榨油后的副产品。花生压滤饼先在水中浸泡约 24h、蒸熟并压入模子中。模子用香蕉叶覆盖并接入好食链孢霉和寡孢根霉。产品发酵 1～2d 后即可食用。有关 Ontjom 发酵作用的详细资料以及这种产品的营养价值已由 Beuchat[6]进行了研究。

参 考 文 献

[1] Agate, A. D., and J. V. Bhat. 1966. Role of pectinolytic yeasts in the degradation of mucilage layer of *Coffea robusta* cherries. *Appl. Microbiol.* 14: 256～260.

[2] Akinrele, I. A. 1970. Fermentation studies on maize during the preparation of a traditional African starch-cake food. *J. Sci. Food Agric.* 21: 619～625.

[3] Banigo, E. O. I., J. M. deMan, and C. L. Duitschaever. 1974. Utilization of high-lysine corn for the manufacture of ogi using a new, improved processing system. *Cereal Chem.* 51: 559～572.

[4] Banigo, E. O. I., and H. G. Muller. 1972. Manufacture of ogi (a Nigerian fermented cereal porridge): Comparative evaluation of corn, sorghum and millet. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 5: 217～221.

[5] Barnard, R. J., A. P. Duran, A. Swartzentruber, A. H. Schwab, B. A. Wentz, and R. B. Read, Jr. 1982. Microbiological quality of frozen cauliflower, corn, and peas obtained at retail markets. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 54～58.

[6] Beuchat, L. R. 1976. Fungal fermentation of peanut press cake. *Econ. Bot.* 30: 227～234.

[7] Bokanga, M. 1995. Biotechnology and cassava processing in Africa. *Food Technol.* 49 (1): 86～90.

[8] Brackett, R. E. 1987. [Fungal spoilage of] vegetables and related products. In *Food and Beverage Mycology*, 2d ed., ed. L. R. Beuchat, 129～154. New York: Van Nostrand Reinhold.

[9] Buckle, K. A., and E. Kartadarma. 1990. Inhibition of bongkrek acid and toxoflavin production in tempe bongkrek containing *Pseudomonas cocovenenans*. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 571～576.

[10] Camargo, R. de, J. Leme, Jr., and A. M. Filho. 1963. General observations on the microflora offermenting cocoa beans (*Theobroma cacao*) in Bahia (Brazil). *Food Technol.* 17: 1328～1330.

[11] Collard, P., and S. Levi. 1959. A two-stage fermentation of cassava. *Nature* 183: 620～621.

[12] Dicks, L. M. T., F. Dellaglio, and M. D. Collins. 1995. Proposal to reclassify *Leuconostocoenos* to *Oenococcus oeni* [corrig.] gen. nov., comb. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 395～397.

[13] Eckert, J. W. 1979. Fungicidal and fungistatic agents: Control of pathogenic microorganisms on fresh fruits and vegetables after harvest. In *Food Mycology*, ed. M. E. Rhodes, 164～199. Boston: Hall.

[14] Engelmann, U., and N. Weiss. 1985. *Megasphaera cerevisiae* sp. nov.: A new Gram-negative obligately anaerobic coccus isolated from spoiled beer. *System. Appl. Microbiol.* 6: 287～290.

[15] Etchells, J. L., H. P. Fleming, and T. A. Bell. 1975. Factors influencing the growth of lactic acid bacteria during the fermentation of brined cucumbers. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, ed. J. G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting, eds., 281～305. New York: Academic Press.

[16] Faparusi, S. I., and O. Bassir. 1971. Microflora of fermenting palm-wine. *J. Food Sci. Technol.* 8: 206～210.

[17] Filho, A. M., and C. W. Hesseltine. 1964. Tempeh fermentation: Package and tray fermentations. *Food Technol.* 18: 761～765.

[18] Frank, H. A., N. A. Lum, and A. S. Dela Cruz. 1965. Bacteria responsible for mucilage layered composition in Kona coffee cherries. *Appl. Microbiol.* 13: 201～207.

[19] Frank, H. A., and A. S. Dela Cruz. 1964. Role of incidental microflora in natural decomposition of mucilage layer in Kona coffee cherries. *J. Food Sci.* 29: 850～853.

[20] Ilany-Feigenbaum, J. J. Diamant, S. Laxer, and A. Pinsky. 1969. Japanese miso-type products prepared by using defatted soybean flakes and various carbohydrate-containing foods. *Food Technol.* 23: 554～556.

[21] Insalata, N. F. J. S. Witzeman, J. H. Berman, and E. Borker. 1968. A study of the incidence of the spores of *Clostridium botulinum* in frozen vacuum pouch-pack vegetables. *Proc., 96th Ann. Meet., Am. Pub. Health Assoc.*, 124.

[22] Jinneman, K. C., P. A. Trost, W. E. Hill, S. D. Weagant, J. L. Bryant, C. A. Kaysner, and M. M. Wekell. 1995. Comparison of template preparation methods from foods for amplification of *Escherichia coli* 0157 Shiga-like toxins type I and II DNA by multiplex polymerase chain reaction. *J. food Protect.* 58: 722～726.

[23] Jones, S. M., and A. M. Paton. 1973. The L-phase of *Erwinia carotovora* var. *atroseptica* and its possible association with plant tissue. *J. Appl. Bacteriol.* 36: 729～737.

[24] Kleyn, J., and J. Hough. 1971. The microbiology of brewing. *Ann. Rev. Microbiol.* 25: 583～608.

[25] Kline, L., and T. F. Sugihara. 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. II. Isolation and characterization of undescribed bacterial species responsible for the souring activity. *Appl. Microbiol.* 21: 459～165.

[26] Kunkee, R. E. 1975. A second enzymatic activity for decomposition of malic acid by malolactic bacteria. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, ed. J. G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting, eds., 29～42. New York: Academic Press.

[27] Levanon, Y., and S. M. O. Rossetini. 1965. A laboratory study of farm processing of cocoa beans for industrial use. *J. Food Sci.* 30: 719～722.

[28] Lee, S. Y., M. S. Mabee, and N. O. Jangaard. 1978. *Pectinatus*, a new genus of the family *Bacteroidaceae*. *Int. J. System. Bacteriol.* 28: 582～594.

[29] London, J. 1976. The ecology and taxonomic status of the lactobacilli. *Ann. Rev. Microbiol.* 30: 279～301.

[30] Lund, B. M. 1971. Bacterial spoilage of vegetables and certain fruits. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 9～20.

[31] McColloch, L. P., H. T. Cook, and W. R. Wright. 1968. Market diseases of tomatoes, peppers, and eggplants. *Agricultural Handbook No.* 28. Washington, DC: Agricultural Research Service, USDA.

[32] Mislivec, P. B., V. R. Bruce, and R. Gibson. 1983. Incidence of toxigenic and other molds in green coffee beans. *J. Food Protect.* 46: 969～973.

[33] Mount, M. S., D. F. Bateman, and H. G. Basham. 1970. Induction of electrolyte loss, tissue maceration, and cellular death of potato tissue by an endopolygalacturonate trans-eliminase. *Phytopathol.* 60: 924～1000.

[34] Mukherjee, S. K., M. N. Albury, C. S. Pederson, A. G. van Veen, and K. H. Steinkraus. 196 Role of *Leuconostoc mesenteroides* in leavening the batter of idli, a fermented food of India. *Appl. Microbiol.* 13: 227～231.

[35] Mundt, J. O., W. F. Graham, and I. E. McCarty. 1967. Spherical lactic acid-producing bacteria of southern-grown raw and processed vegetables. *Appl. Microbiol.* 15: 1303～1308.

[36] Okafor, N. 1972. Palm-wine yeasts from parts of Nigeria. *J. Sci. Food Agric.* 23: 1399～1407.

[37] Okafor, N. 1975. Microbiology of Nigerian palm wine with particular reference to bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 38: 81～88.

[38] Okafor, N. 1975. Preliminary microbiological studies on the preservation of palm wine. *J. Appl. Bacteriol.* 38: 1～7.

[39] Passmore, S. M., and J. G. Carr. 1975. The ecology of the acetic acid bacteria with particular reference to cider manufacture. *J. Appl. Bacteriol.* 38: 151～158.

[40] Passos, F. M. L., D. O. Silva, A. Lopez, C. L. L. F. Ferreira, and W. V. Guimaraes. 1984. Characterization and distribution of lactic acid bacteria from traditional cocoa bean fermentations in Bahia. *J. Food Sci.* 49: 205～208.

[41] Patel, I. B., and R. H. Vaughn. 1973. Cellulolytic bacteria associated with sloughing spoilage of California ripe olives. *Appl. Microbiol.* 25: 62～69.

[42] Pedersom, C. S. 1979. *Microbiology of Food Fermentations*, 2d ed. Westport, CT: AVI.

[43] Pederson, C. S., and R. S. Breed. 1946. Fermentation of coffee. *Food Res.* 11: 99～106.

[44] Pilone, G. J., and R. E. Kunkee. 1976. Stimulatory effect of malo-lactic fermentation on the

growth rate of *Leuconostoc oenos*. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 405～408.

[45] Plastourgos, S., and R. H. Vaughn. 1957. Species of *Propionibacterium* associated with zapatera spoilage of olives. *Appl. Microbiol.* 5: 267～271.

[46] Prescott, S. C., and C. G. Dunn. 1959. *Industrial Microbiology*. New York: McGraw Hill.

[47] Radler. F. 1975. The metabolism of organic acids by lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, ed J. G. Carr. C. V. Cutting, and G. C. Whiting, eds. 17～27. New York: Academic Press.

[48] Rafil, F, M. A. Holland, W. E. Hill, and C. E. Cerniglia. 1995. Survival of *Shigella flerneri* on vegetables and detection by polymerase chain reaction. *J. Food Protect.* 58: 727～732.

[49] Rainbow, C. 1975. Beer spoilage lactic acid bacteria. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, ed. J. G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting, eds., 149～158. New York: Academic Press.

[50] Reddy, N. R., S. K. Sathe. M. D. Pierson, and D. K. Salunkha. 1981. Idli. an Indian fermented food: A review, *J. Food Qual.* 5: 89～101.

[51] Roberts, D. P., P. M. Berman, C. Allen, V. K. Stromberg, G. H. Lacy, and M. S. Mount. 1986. Requirement for two or more *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora* pectolytic gene products for maceration of potato tuber tissue by *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 167: 279～284.

[52] Roelofsen, P. A. 1958. Fermentation, drying, and storage of cacao beans. *Adv. Food Res.* 8: 225～296.

[53] Rohan, T. A. 1964. The precursors of chocolate aroma: A comparative study of fermented and unfermented cocoa beans. *J. Food Sci.* 29: 456～459.

[54] Rohan, T. A. and T. Stewart. 1966. The precursors of chocolate aroma: Changes in the sugars during the roasting of cocoa beans. *J. Food Sci.* 31: 206～209.

[55] Rose, A. H. 1982. *Fermented Foods*. Economic Microbiology Series, 7. New York: Academic Press.

[56] Schleifer, K. H., M. Leuteritz, N. Weiss, W. Ludwig, G. Kirchhof. and H. Seidel-Rufer. 1990. Taxonomic study of anaerobic, Gram-negative, rod-shaped bacteria from breweries: Emended description of *Pectinatus cerevisiiphilus* and description of *Pectinatus frisingensis* sp. nov., *Selenomonas lactifex* sp. nov., *Zymophilus paucivorans* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol* 19: 19～27.

[57] Shieh, Y. -S. G., and L. R. Beuchat. 1982. Microbial changes in fermented peanut and soybean pastes containing kojis prepared using *Aspergillus oryzae* and *Rhizopus oligosporus*. *J. Food Sci.* 47: 518～522.

[58] Splittstoesser, D. F. 1987. [Fungal spoilage of] fruits and fruit products. In *Food and Beverage Mycology*, 2d ed., ed. L. R. Beuchat, 101～128. New York: Van Nostrand Reinhold.

[59] Splittstoesser, D. F. 1973. The microbiology of frozen vegetables. How they get contaminated and which organisms predominate. *Food Technol.* 27: 54～56.

[60] Splittstoesser, D. F., and D. A. Corlett, Jr. 1980. Aerobic plate counts of frozen blanched vegetables processed in the United States. *J. Food Protect.* 43: 717～719.

[61] Splittstoesser, D. F., and I. Gadjo. 1966. The groups of micro-organisms composing the "total" count population in frozen vegetables. *J. Food Sci.* 31: 234～239.

[62] Splittstoesser, D. F., G. E. R. Hervey, II, and W. P. Wettergreen. 1965. Contamination

of frozen vegetables by coagulase-positive staphylococci. *J. Milk Food Technol.* 28: 149～151.

[63] Splittstoesser, D. F., D. T. Queale, J. L. Bowers, and M. Wilkison. 1980. Coliform content of frozen blanched vegetables packed in the United States. *J. Food Safety* 2: 1～11.

[64] Splittstoesser, D. F., W. P. Wettergreen, and C. S. Pederson. 1961. Control of microorganisms during preparation of vegetables for freezing. I. Green beans. *Food Technol.* 15: 329～331.

[65] Steinkraus, K. H., A. G. van Veen, and D. B. Thiebeau. 1967. Studies on idle As Indian fermented black gram-rice food. *Food Technol.* 21: 916～919.

[66] Subik, J., and M. Behun. 1974. Effect of bongkrekic acid on growth and metabolism of filamentous fungi. *Arch. Microbiol.* 97: 81～88.

[67] Sugihara, T. F., L. Kline, and M. W. Miller. 1971. Microorganisms of the San Francisco sour dough bread process. I. Yeasts responsible for the leavening action. *Appl. Microbiol.* 21: 456～458.

[68] Van Pee, W., and J. M. Castelein. 1972. Study of the pectinolytic microflora, particularly the *Enterobacteriaceae*, from fermenting coffee in the Congo. *J. Food Sci.* 37: 171～174.

[69] van Veen, A. G. 1967. The bongkrek toxins. In *Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins*, ed. R. I. Mateles and G. N. Wogan, 43-50. Cambridge, MA: MIT Press.

[70] van Veen, A. G., and W. K. Mertens. 1934. Die Gifstoffe der sogenannten Bongkrek-vergiftungen auf Java. *Rec. Trav. Chim.* 53: 257～268.

[71] van Veen, A. G., and W. K. Mertens. 1934. Das Toxoflavin, der gelbe Gifstoff der Bongkrek. *Rec. Trav. Chim.* 53: 398～404.

[72] Vaughn, R. H. 1975. Lactic acid fermentation of olives with special reference to California conditions. In *Lactic Acid Bacteria in Beverages and Food*, ed. J. G. Carr, C. V. Cutting, and G. C. Whiting, eds., 307-323. New York: Academic Press.

[73] Vaughn, R. H., T. Jakubczyk, J. D. MacMillan, T. E. Higgins, B. A. Dave, and V. M. Crampton. 1969. Some pink yeasts associated with softening of olives. *Appl. Microbiol.* 18: 771～775.

[74] Vauterin, L., B. Hoste, K. Kersters, and J. Swings. 1995. Reclassification of *Xanthomonas*. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 472～489.

[75] Vescova, M., C. Orsi, G. Scolari, and S. Torriani. 1995. Inhibitory effect of selected lactic acid bacteria on microflora associated with ready-to-use vegetables. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 121～125.

[76] Vogel, R. F., G. Bocker, P. Stolz, M. Ehrmann, D. Fanta, W. Ludwig, B. Pot, K. Kersters, K. H. Schleifer, and W. P. Hammes. 1994. Identification of lactobacilli from sourdough and description of *Lactobacillus pontis* sp. nov, *Int. J. System. Bacteriol.* 44: 223～229.

[77] Watt, B. K., and A. L. Merrill. 1950. Composition of foods—raw, processed, prepared. *Agricultural Handbook No.* 8, Washington, DC: USDA.

[78] Williamson, D. H. 1959. Studies on lactobacilli causing ropiness in beer. *J. Appl. Bacteriol.* 22: 392～402.

[79] Yaping, J., L. Xiaoyang, and Y. jiaqi. 1990. *Saccharobacter fermentatus* gen. nov., sp. nov., a new ethanol-producing bacterium. *Int. J. System. Bacteriol.* 40: 412～414.

[80] Yong, F. M., and B. J. B. Wood. 1971. Microbiology and biochemistry of the soy sauce fermentation. *Adv. Appl. Microbiol.* 17: 157～194.

[81] Zhao, N., C. Qu, E. Wang, and W. Chen. 1995. Phylogenetic evidence for the transfer of *Pseudomonas cocovenenans* (van Damme et al. 1960) to the genus *Burkholderia* as *Burkholderia cocovenenans* (van Damme et al. 1960) comb. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 45: 600～603.

9. 各类食品

本部分简述了各类食品以及它们在新鲜和腐败时的微生物菌相的有关情况。

9.1 熟食及相关食品

食用诸如沙拉和三明治等食品时有时会出现食物中毒现象。这些食品通常是手工制作的，这种直接接触增加了引起食物中毒微生物（诸如葡萄球菌等）污染的机会。沙拉配料预煮后，其中正常菌群的数量有所降低。因此一旦这些致病菌污染肉类沙拉或三明治，它们就能很好地生长。

在零售沙拉和三明治的一项研究中，53 份沙拉中有 36%所含细菌数大于 lg6.00/g，而 60 份三明治中仅 16%达到这么高的水平[4]。57%的三明治其大肠菌群数小于 lg2.00/g，在 60%的三明治和 39%的沙拉中检出了金黄色葡萄球菌。酵母菌和霉菌含量较高，6 个样品的真菌数大于 lg6.00/g。

对来自 170 家生产厂家的 517 份沙拉进行研究后发现：71%～96%样品的 APC＜lg5.00/g。96%～100%的沙拉含凝结酶阳性的金黄色葡萄球菌，其菌量＜lg2.00/g。沙拉的品种有鸡肉、鸡蛋、通心面和虾沙拉等。而在另一份研究中却发现沙拉中金黄色葡萄球菌的数量较低，为 6～64[10]。这些学者对 12 份不同沙拉的质量进行了检测，样品的总菌数在 lg2.08～lg6.76，其中蛋、虾和一些通心面沙拉的含菌量最高。在这些产品中都没有检出沙门氏菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌[10]。Harris 等人对 42 份沙拉样品进行的研究表明：这类产品的卫生质量通常较好，6 种不同产品的 APC 平均值为 lg5.54/g，大肠菌群数平均为 lg2.66/g。在一些产品中，尤其是在汉堡沙拉中发现有葡萄球菌的存在。

在新鲜绿色蔬菜沙拉中，卷心菜丝沙拉样品的总菌数平均为 lg6.67；绿色蔬菜沙拉为 lg7.28[11]。26%的混合蔬菜沙拉、28%的绿色蔬菜沙拉、29%的卷心菜丝沙拉样品中发现含有粪肠杆菌。而金黄色葡萄球菌的检出率分别为 8%、14%和 3%。就欧芹而言，在 64 份新鲜未洗的样品中有 11 份含有大肠杆菌，50%以上的冷冻样品含大肠杆菌[19]。而新鲜洗净的欧芹的 APC 平均值为 lg7.28/g。所有检测样品中均未检出沙门氏菌和金黄色葡萄球菌。

Surkiewicz[21]对在卫生状况较差的工厂里生产的人造奶油馅饼的微生物质量进行检验后发现：产品携带的微生物数量随各个操作步骤的进行而相继增加。例如，经过 71℃处理后的混合馅饼基料的最终混合物中，细菌含量＜lg2.00/g。但经一夜贮藏后，菌数达到 lg4.15。与馅饼基料混合的馅饼顶端配料，其菌数相当低，为 lg2.78/g。加至馅饼上后，馅饼顶端配料的菌数升至 lg7.00/g。对一种法式油炸食品的微生物质量进行研究后，Surkiewicz 等人[20]得出了同样的菌数变化规律——那就是：微生物数量随加工过程的进行而不断增加。由于这类食品在经各加工过程后才进行油炸处理，因此最终产品的微生

物检出率并不能正确反应加工过程中的实际卫生状况。

1187 份冷冻饼干面团的 APC 的几何平均值为 34，000/g，而真菌、大肠菌群、埃希氏大肠杆菌和金黄色葡萄球菌的 APC 几何平均数分别为 46/g、11/g、<3/g 和<3/g[42]。实验中同时发现，1396 份小吃糕点的 APC 几何平均数是 910/g，大肠菌群、埃希氏大肠杆菌和金黄色葡萄球菌均小于 3/g（见表 9.1）。

对 580 份冷冻奶油型馅饼（柠檬，椰子、巧克力和香蕉）的细菌构成进行研究，结果表明：该批产品卫生质量极佳，98%样品的 APC<lg4.70。其它有关食品的微生物数量列于表 9.1 中。

表 9.1　　各类食品微生物数量概览

食　　品	样品数	微生物指标	符合指标的样品数/%	参考文献
冷冻奶油型馅饼	465	APC≤10^4/g	96	43
		真菌≤10^4/g	98	
		大肠菌群<10/g	89	
		埃希氏大肠杆菌<10/g	99	
		金黄色葡萄球菌<25/g	99	
		沙门氏菌：无	100	
冷冻沾有面包屑的洋葱圈（预煮或部分已煮）	1590	30℃APC<10^5/g	99	47
		大肠菌群 MPN<3/g	89	
		大肠杆菌 MPN<3/g	99	
		金黄色葡萄球菌 MPN<10/g	99.6	
冷冻金枪鱼肉馅饼	1290	30℃APC<10^5/g	97.6	47
		大肠菌群 MPN<64/g	93	
		大肠杆菌 MPN<3/g	97	
		金黄色葡萄球菌 MPN<10/g	98	
豆腐	60	APC<10^6/g	83	36
		适冷菌<10^5/g	83	
		大肠菌群<10^3/g	67	
		金黄色葡萄球菌<10/g	100	
食品级明胶	185	APC<3.00/g	74	24
熟食店沙拉	764	界于部队军需配给要求的微生物卫生质量标准之间	44	10
	764	APC≤5.00/g	81	10
	764	大肠菌群≤1.00/g	78	10
	764	酵母菌和霉菌≤1.30/g	55	10
	764	粪链球菌 1.00/g	77	10
	764	存在金黄色葡萄球菌	9	10
	764	存在产气荚膜芽孢杆菌、沙门氏菌	0	10
	517	APC≤5.00/g	26～85	30
	517	大肠菌群≤2.00/g	36～79	30
	517	金黄色葡萄球菌≤2.00/g	96～100	30

续表

食　　品	样品数	微生物指标	符合指标的样品数/%	参考文献
零售沙拉	53	APC>6.00/g	36	4
		大肠菌群≤2.00/g	57	
		存在金黄色葡萄球菌	39	
零售三明治	62	APC6.00/g	16	4
		大肠菌群 3.00/g	12	
		出现金黄色葡萄球菌	60	
进口香料和草本植物	113	APC≤6.00/g	73	18
	114	孢子数≤5.00/g	75	
	113	酵母和霉菌≤5.00/g	97	
	114	TA 孢子≤3.00/g	70	
	114	存在大肠杆菌、金黄色葡萄球菌、沙门氏菌	0	
加工香料	114	APC≤5.00/g	70	35
	114	APC≤6.00/g	91	35
	114	大肠菌群≤2.00/g	97	35
	114	酵母和霉菌≤4.00/g	96	35
	114	产气荚膜梭状芽孢杆菌<2.00/g	89	35
	110	存在蜡状芽孢杆菌	53	34
脱水航空食品	129	APC<4.00/g	93	33
	129	大肠菌群<1/g	98	
	129	埃希氏大肠杆菌 1/g 内阴性	99	
	102	粪链球菌 1.30/g	88	
	104	金黄色葡萄球菌 5/g 内阴性	100	
	104	沙门氏菌 10/g 内阴性	98	

注：APC 为有氧平板计数；MPN 为最大可能值。

9.2 鸡蛋

鸡蛋利用其自身防护机制可以抵御外界微生物的入侵。从蛋的外部结构看，新鲜鸡蛋外面有三层结构，即外层蜡状壳膜、壳、内层壳膜（图 9.1），每一层都在不同程度上有抵制微生物入侵的功能。从鸡蛋内部成分看，蛋清中含有溶菌酶，这种酶能有效地抵制革兰氏阳性菌的生长；蛋清中还含有抗生蛋白，它能与维生素 H 形成复合物，使得微生物无法利用这一生长所需的维生素。另外，蛋清的 pH 高（约 9.3），并且含伴清蛋白，这种蛋白和铁形成复合物，使其不能为微生物所利用。但另一方面，鲜鸡蛋蛋黄的营养成分和 pH（约 6.8）又为绝大多数的微生物提供了良好的生长条件。

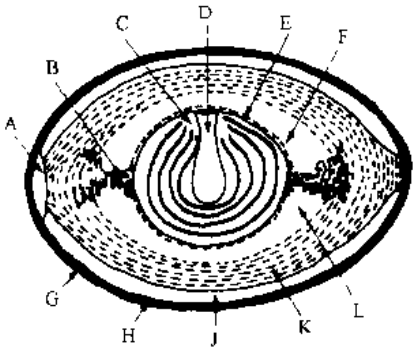


图 9.1　鸡蛋的结构（长轴截面）

A—气室　B—卵带　C—蛋黄　D—胚盘和白卵黄　E　卵黄膜　F—黏蛋白膜　G—壳　H　壳膜　J—卵白外部稀薄层　K—卵白厚层　L—卵白内部稀薄层

新产鸡蛋通常是无菌的，但放置很短的一段时间后，鸡蛋外面就会长有许多微生物。在条件适宜的情况下，这些微生物就可能进入鸡蛋内生长并导致蛋的腐败。细菌进入蛋内的速度与贮藏时间、蛋龄以及污染程度有关。使用CO_2气体制冷的冷却方法与传统制冷法相比，能更迅速地冷却鸡蛋，从而使其内部细菌数更少，即使7℃下保存30d也不会引起明显的质量变化[6]。对860只鸡蛋人为接入肠炎沙门氏菌，研究其从蛋清迁移至蛋黄的过程后发现：根据储藏温度和污染程度的不同，最快的在1d内就可在蛋黄中检测到该菌。这种迁移现象在30℃时1d内就可发生，而在7℃时14d后才发生[11]。而且，1d蛋龄的鸡蛋对菌迁移的抗性要比4周蛋龄的鸡蛋强。细菌迁移的速度与污染程度呈正相关性。鸡蛋中存在的菌主要为下列属的一些细菌：假单胞菌、不动细菌、变形杆菌、气单孢菌、产碱杆菌、埃希氏杆菌、微球菌、沙门氏菌、赛氏杆菌、肠细菌、黄杆菌属和葡萄球菌。常见的霉菌有毛霉、青霉、单孢枝霉、芽枝霉等。球拟酵母是惟一能检出的酵母菌。鸡蛋细菌性腐败是普通的形式是腐败（rotting）。绿色腐败（green rots）是由假单胞菌，特别是荧光假单胞菌引起的；无色腐败（colorless rots）是由假单胞菌、不动菌及其它菌种引起的；黑色腐败（black rots）的原因菌是一些变形杆菌、假单胞菌和气单孢菌；粉红色腐败（pink rots）是由赛氏杆菌属菌引起的；蛋黄色腐败（custard rots）是由普通变形杆菌和同质假单胞菌引起的。鸡蛋的霉菌腐烂通常以小尖点形式出现。通过光照可见蛋内部有菌丝体的生长。青霉和芽枝霉是引起小尖点和鸡蛋真菌腐败最常见的原因菌。细菌也会引起蛋的霉烂，浓味假单胞菌和变形杆菌是引起这种变质的原因菌。浓味假单胞菌引起的蛋的腐败是最有特征的腐败类型。

高湿度有利于微生物进入鸡蛋，也有利于鸡蛋表面微生物的生长，继而进入蛋壳和内膜。内膜是阻止细菌侵入鸡蛋最重要的一道屏障，其次是壳和外膜[25]。蛋黄中的细菌要比蛋清中的多。蛋清中微生物数量相对较少的原因极可能是蛋清中含有抗生素类物质。另外，经贮藏后，卵白厚层将水分传至卵黄，导致蛋黄变稀和卵白厚层萎缩。这一现象使得蛋黄可直接接触蛋壳内膜，从而造成与微生物的直接接触。微生物一旦进入蛋黄，在这种营养介质中细菌能良好地生长，代谢分解蛋白质和氨基酸，产生诸如H_2S和其它异臭化合物附产物。这些菌的生长会引起蛋黄变黏和变色。因为霉菌是需氧菌，故一般先在气袋（air sac）区域繁殖生长。在湿度较高的情况下，在鸡蛋表层就可看到有霉菌生长。在温度和湿度都较低的情况下，虽然鸡蛋表面霉菌生长的现象可以减少，但鸡蛋会以较快速度脱水，这对产品的销售是不利的。

在第二部分3中已提到了鸡蛋的抗菌系统。另外，鸡蛋蛋清中还含有卵运铁蛋白和卵黄素蛋白。卵运铁蛋白能与金属离子、尤其是Fe^{3+}螯合，卵黄素蛋白能结合核黄素。在正常pH9.0～10.0及温度分别为30℃和39.5℃下，蛋清能杀灭G(-)菌和酵母菌[44]，Fe的加入会降低蛋清的抗菌特性。

9.3 蛋黄酱和沙拉调料

蛋黄酱是一种半固体乳剂，由食用油、蛋黄或整蛋，醋和（或）柠檬汁，以及其它诸如盐等调味剂和葡萄糖等成分组成，成品中含不少于50%的食用油。蛋黄酱的pH在

3.6～4.0之间。作为主要酸性来源的醋酸占总量的0.29%～0.5%，A_w为0.925。水相中含9%～10%的盐和7%～10%的糖[38]。沙拉调料在组成上与蛋黄酱极其相似，但其成品中至少含30%食用油，A_w为0.929，pH在3.2～3.9之间。作为主要酸性来源的醋酸占总量的0.9%～1.2%。水相含3.0%～4.0%的盐和20%～30%的糖[38]。虽然这类产品的营养成分很适宜于许多腐败细菌的生长，但其pH、有机酸和低A_w限制了酵母、一些细菌和霉菌等一些腐败菌的生长。但是拜列氏接合酵母可引起沙拉调料、番茄酱、充气饮料和一些酒类的腐败。酵母属中的某些酵母会导致蛋黄酱、沙拉调料和法国调料的腐败。这类食品中两种主要的腐败菌是食果糖明串珠菌和拜列氏接合酵母。另一种常见腐败菌是短乳杆菌*lindneri*亚种，200mg/kg的乳链菌素可以在90d的培养期内有效抑制短乳杆菌*lindneri*亚种在pH为3.3～4.2酪乳调料上的生长[28]。

普通芽孢杆菌可引起千岛调料（Thousand Island dressing）乳浊液分层和变黑，人们在一项有关千岛调料腐败的研究中发现：普通芽孢杆菌来源于产品配料中的辣椒和甜辣椒[32]。这一类型产品的霉菌腐败在氧气充足时也只发生在产品的表面。尽管产生气泡和丁酸臭味也许发生在乳浊液分层之前，但乳浊液分层现象是这些食品腐败的第一信号。很明显，腐败菌对糖进行发酵代谢。产品的低pH特性抑制了分解蛋白质和脂肪细菌的生长，因此在这种条件下酵母和乳酸菌为主导菌也就不足为奇了。在对17份腐败的蛋黄酱、类蛋黄酱和蓝色奶酪调料样品的研究中，Kurtzman等人[23]发现在绝大多数样品中酵母菌数量较高，两份样品中含有大量的乳酸菌。样品的pH在3.6～4.1之间。2/3的腐败样品中含拜列氏接合酵母。一些样品中均存在食果糖明串珠菌，而只有两份样品中存在需氧芽孢菌。10份未腐败的样品，细菌很少或者根本检测不出。

至于食物传染的病原菌，由于低pH、酸以及低A_w的协同作用，使得这些类型的细菌不能在这些产品中生存生长[38]。第七部分24中讨论了埃希氏大肠杆菌中产生类志贺氏毒素的菌株在蛋黄酱中致死的情况。

9.4 谷物、面粉和面团制品

小麦、黑麦、玉米以及相关食品的微生物菌相可以反映种植这些作物的土壤、贮存环境及这些作物在加工过程中受微生物污染的情况。虽然这类产品的蛋白质及碳水化合物含量较高，但其A_w较低，在适宜的贮存条件下，它们能抑制所有细菌的生长。面粉中的菌数相对较低，是由于加入一些漂白剂降低了菌的数量的缘故。但在适宜的A_w下，芽孢杆菌属和几种霉菌通常能在面粉中生存。许多需氧芽孢菌都能产生淀粉酶，在有充足水分存在的情况下，这些菌通过淀粉酶可利用面粉和相关食品作为能源而生长。若湿度低的情况下，霉菌也能生长，但此时只能看到典型的菌丝体生长和形成孢子。根霉属中的一些菌最为常见，可利用其黑色孢子这一特征加以识别。

新鲜冷冻面团制品，例如黄油饼干、主食和甜面包卷以及比萨饼面团的腐败主要是由乳酸菌引起的。在Hesseltine[16]等人的一项研究中，分离得到的细菌中92%是乳酸菌，超过半数是乳酸杆菌，35%是明串珠菌，3%是链球菌。而在腐败产品中霉菌的数量一般较少，新鲜产品中乳酸细菌数高达lg8.33/g。

9.5 焙烤制品

工业化生产的面包如果加工方法得当，一般没有足量的水分供除霉菌以外的菌生长。引起面包霉变最常见的菌是葡枝根霉；红色面包霉变是好食链孢霉引起的；面包在低湿度下贮存能抑制霉菌的生长，这类腐败通常只有在面包贮藏在高湿度或者面包还未冷透时就包装的情况下才能见到。自制面包会发生黏性腐败，这类腐败是由枯草芽孢杆菌（马铃薯芽孢杆菌）的某些菌株引起的。将一面团仔细掰成两部分，若能看到黏丝就可判定是黏性腐败。引出黏性腐败的菌来源于面粉，在适宜的温度下面团放置时间过长会引起该菌的生长。

各种类型的糕点由于其含糖量一般较高，限制了细菌对水的利用，因此很少发生细菌性腐败。这类食品最普遍的腐败形式是发霉。霉菌来自于几乎所有制作糕点的原料，特别是糖、坚果和香料。尽管通常在焙烤过程中足以杀灭这些细菌，但许多细菌可以通过糖衣、蛋白酥皮、顶端配料等进入食品中。另外，霉菌也可在加工过程中和从空气中进入焙烤糕点。高湿度条件有利于霉菌在糕点表面的生长。在一些水果糕中，若水果是在糕点焙烤后放在制品表层的，则细菌就会从果仁和水果下开始生长。霉菌在面包和糕点上的持续生长会导致这些食品发硬（hardening）。

9.6 冷冻肉馅饼

自冷冻肉馅饼第一次上市以来，其卫生质量稳步上升。产品中添加任何一种成分都可能增加产品的总菌数，最终产品的总菌数能反映配料、加工和贮藏的全面质量。许多研究者认为这类产品的总菌数不应超过 lg5.00/g。对 48 份肉馅饼进行质量检验后发现：84%产品的 APC<lg5[27]。而在另一项对 188 份肉馅饼的研究中，人们发现，93%样品的 APC<lg5.00[29]。因此，lg5.00 作为这类制品的微生物质量指标是可行的（见第六部分 19 中有关微生物标准和指标的详细资料）。

对 1290 份冷冻金枪鱼肉馅饼的研究结果表明：在 35℃时 APC 的几何平均数是 lg3.20，而 30℃时为 lg3.38g[47]，大肠菌群的平均数为 5/g，埃希氏大肠杆菌数<3/g，金黄色葡萄球菌数<10/g（表 9.1）。

9.7 糖、糖果和香料

这些制品在按要求进行制备、加工和贮藏的情况下，很少发生细菌性腐败。这主要是因为在这类产品中通常缺乏可供细菌利用的水分。甘蔗和甜菜糖中可能存在微生物，其中以芽孢杆菌属和梭状芽孢杆菌属中的菌为主。这些菌有时会给罐头生产带来一些麻烦（见第五部分 16）。如果糖在高湿度条件下贮藏，这些细菌中的某些菌很可能就会生长，而且通常生长在暴露的表层。当然，这些菌能在糖中良好生长的原因除了它们能获得碳水化合物外，还在于其生长环境中有可利用的水分和其它基本营养成分的存在。拟圆酵母

和酵母属（接合酵母属）中的一些嗜高渗酵母会导致高水分糖的变质。据报道，这些细菌能引起糖的转变，在制糖工业中最可能带来麻烦的细菌是肠膜状明串珠菌。该菌能水解蔗糖，而后合成右旋葡糖多聚体即糊精。这些黏性多聚体有时会阻塞蔗糖溶液流经的管道和线路。

据报道，糖果中的奶油夹心巧克力会发生细菌性腐败，有时还会发生产品爆裂现象。其原因菌是梭状芽孢杆菌，尤其是生芽孢梭状芽孢杆菌。这些菌是通过糖、淀粉和其它成分进入这些产品之中的。

在一般情况下，香料不会发生细菌性腐败，但在有足够水分存在时，霉菌和一些细菌却能在一些不含抗菌成分的香料中生长。据报道，芥末制品的腐败通常是由酵母菌和变形杆菌及芽孢杆菌引起的，并常伴有发酵产气现象。通常采用氧化丙烯来处理香料以减少细菌量，而仍然残留的菌基本上是芽孢菌和霉菌。低水分情况下，一般不会发生由细菌引起的质量问题。

一些香料的微生物概览见表 9.1 所示。在最近一项对澳大利亚市场上制品的研究中，研究人员发现：160 份样品中都无可确认的金黄色葡萄球菌的存在，只有一份样品对沙门氏菌——亚利桑那沙门氏菌呈阳性[22]。样品中含菌数最高的是香料（2.6×10^7/g）和黑胡椒（2.2×10^7/g），160 份样品中有半数以上是肠道细菌阳性，有半数以上 APC 在10^4～10^6cfu/g[22]。160 份样品中只有 3 份（全是甜辣椒）样品可能含有产黄曲霉毒素的真菌。

9.8 果仁

诸如美洲山核桃和胡核桃等产品一般含有很高的脂肪含量，而水分含量较低（表 9.2）。这些特性决定了它们对腐败细菌的作用有相当高的稳定性。但产品如贮存在高湿度环境下，霉菌可在这类食品中生长。果仁中可以检测出许多种霉菌，它们都是在产品收集、捣碎、分类和包装等过程中混入进来的（有关果仁中黄曲霉毒素问题可见第七部分 27 中的讨论）。

表 9.2 各类食品的组成[46] 单位：%

食　品	水分	碳水化合物	蛋白质	脂　肪	灰　分
啤酒（4%酒精）	90.2	4.4	0.6	0.0	0.2
面包、富强粉	34.5	52.3	8.2	3.3	1.7
黄油	15.5	0.1	0.6	81.0	2.5
蛋糕	19.3	49.3	7.1	23.5	0.8
Figbars	13.8	75.8	4.2	4.8	1.4
啫喱	34.5	65.0	0.2	0.0	0.3
人造奶油	15.5	0.4	0.6	81.0	2.5
蛋黄酱	1.7	21.0	26.1	47.8	3.4
花生酱	16.0	3.0	1.5	78.0	1.5

续表

食　品	水分	碳水化合物	蛋白质	脂　肪	灰　分
杏仁（干）	4.7	19.6	18.6	34.1	3.9
巴西坚果	5.3	11.0	14.4	65.9	3.4
腰果	3.6	27.0	18.5	48.2	2.7
花生	2.6	23.6	26.9	44.2	2.7
美洲山核桃	3.0	13.0	9.4	73.0	1.6
平均	3.8	18.8	17.6	57.1	2.7

注：摘自 Watt 和 Merrill[45]。

9.9 脱水食品

在对脱水汤料的微生物特性进行详细研究后，Fanelli 等人[28,29]发现：产自于 9 个不同生产商的大约 17 种不同类型的脱水汤料，其细菌总数<lg5.00/g。这些汤料包括鸡汁面条、鸡汁米饭、牛肉面条、蔬菜、蘑菇、豌豆、洋葱、西红柿及其它汤料等。有些制品的细菌总量高达 lg7.3/g，有些却较低，只有 lg2.00。这些研究者还发现复水的脱水洋葱汤料的平均总菌数为 lg5.11/mL、大肠菌群数为 lg3.00/mL、需氧芽孢菌数为 lg 4.00/mL、酵母和霉菌<lg1.08/mL。经烧煮后，细菌数就下降到平均 lg2.15/mL，而大肠菌群值降至<lg0.26/mL，芽孢菌数降至 lg1.64/mL，酵母和霉菌数降至<lg1.00/mL。对脱水沙司和肉汁混合物、汤料混合物、通心面条沙司混合物及奶酪沙司混合物进行研究后发现，在 50 份样品中有 10 份分离检出产气荚膜梭状芽孢杆菌[29]，兼性厌氧菌菌数在（lg3.00～lg6.00）/g。

对 185 份食品级干明胶样品的卫生质量进行了检验，没有一个样品的 APC 超过 lg3.70/g[24]。所测的 129 份脱水航空食品中有 93% 的样品所含的细菌总数<lg 4.00/g[33]。

鸡蛋粉和乳粉中的微生物数量通常较高，大约为（lg6～lg8）/g。干制品中细菌数普遍较高的原因之一是细菌浓度随制品的浓缩而升高，在水果浓缩汁中也同样如此，其所含的细菌数要比新鲜的、未经浓缩的制品高。

对生南瓜子的细菌类型和检出率情况进行调查后发现，12 个该类食品样品的平均总菌数为 lg7.99/g，大肠菌群数为 lg4.72/g。绝大多数为非粪型（nonfecal type）大肠菌群。在这些瓜子中添加面粉糊和盐并经焙烤后其总菌数降至<lg2.00/g。

9.10 肠道营养液（医疗食品）

肠道营养液（ENS），又称医疗食品，是一种通过输液形式供给人体的液态食品。它以干品或液态形式供给，而干品在使用前要进行复水处理。这类食品一般由医院或其它病人护理机构供给一些特殊病人使用，但也可在家中使用。在室温下，ENS 经肠道进食袋（enteral feeding bag）以连续滴液形式进入人体，其过程可持续 8h 或更长。工业化生产的肠道食品可分为完全膳食和不完全膳食两种，前者在使用前仅需进行复水处理，而后者在食

用前需补加牛乳、鸡蛋和其它相关营养食品。ENS 制品可按照特定营养要求进行制备，根据不同的病人对象，产品中蛋白质、多肽、碳水化合物等营养成分的含量有所不同。

ENS 的微生物特性已由几位医院研究人员进行了研究，结果发现这类产品含有不同数量和种类的细菌，这可能是造成有些病人输液时感染的原因。有些肠道营养液在注入时的细菌数就高达 10^6/mL[12]。对一份复水的 ENS 产品进行研究后发现，室温下经 8h 后，输液的细菌数由最初的 9×10^3/mL 增至 7×10^4/mL[17]。同批的另一份样品其细菌数竟高达 1.2×10^5/mL。其中最常检出的菌是表皮葡萄球菌，其它诸如棒状杆菌、柠檬酸细菌和不动杆菌也有检出。一份英国的研究报告指出，肠道食物含 $10^4\sim10^6$/mL 的菌，且主要是一些大肠菌群和铜绿假单胞菌[13]。

在使用情况下，5 种不同 ENS 产品具有促使阴沟肠细菌生长的能力已得到证实[7]。与对照组相比，加 0.2%山梨酸钾可使该菌的菌数降低 3 个 lg 周期。已发现有病人由于输入 ENS 而发生阴沟肠细菌和肠炎沙门氏菌感染的事例[3,13]。在 ENS 配制和处理过程中必须使上述的细菌问题降至最低已成为人们的共识[7,15]。有关 ENS 微生物方面的详细资料可见参考文献[7]；有关 ENS 或医疗食品的发展历史及其它非微生物方面的问题的阐述可见参考文献[37]。

9.11 单细胞蛋白

早在 1900 年就有人建议将培养的单细胞微生物作为人类食品的直接来源。大约在 1966 年左右，麻省理工学院首先指出了单细胞蛋白（SCP）这一概念，用以称呼作为食物来源的微生物[39]。由于蛋白质不是菌丝体细胞惟一的食物组分，因此从这一角度讲，SCP 是一个错误的名词。但它可以作为“藻类蛋白”、“酵母细胞蛋白”等的统称。虽然作为人类食物潜在和实际来源的 SCP 与本部分提到的其它食品有所不同，但除了它来自藻类细胞这一点外，其加工方式与其它食品极其相似。

9.11.1 SCP 生产的理论基础

为了保证我们的后代有足够的食物，寻找新的食物资源已迫在眉睫。理想食物资源的基本要求是：营养全面，而且具有最低的生产土地、时间和成本要求。SCP 除了符合这些要求外，其最大特点是能利用各种废料进行生产。SCP 与动植物蛋白相比，其明显的优点在于[12,40]：

①微生物生长代时非常短，因而其生产速度较快；

②微生物易进行基因修饰，可以制造出符合要求的理想菌种；

③蛋白质含量高；

④可以利用易大量获得的原材料进行 SCP 的生产；

⑤SCP 的生产可以连续培养的方式进行，不受气候变化的影响。

与动、植物蛋白的生产相比，微生物蛋白的生产具有高速度和高效率的特点。下列数据可以说明这个问题：1000lb（454kg）的牛约产 1lb（0.454kg）新蛋白/d；同样条件下大豆（播种季节按比例均摊）约产 80lb（36.3kg）新蛋白质，而酵母则能产约 50t。

9.11.2 微生物及发酵底质

已对许多藻类、酵母、霉菌和细菌作为SCP来源的可能性进行了研究，其中最有希望成为SCP来源菌的如下：

藻类：绿藻属和栅列藻属。

酵母：季也蒙氏假丝酵母、产蛋白假丝酵母、解脂假丝酵母、热带假丝酵母、克洛氏德巴利氏酵母、*Candida famata*、*C. methanosorbosa*、赤毕氏酵母、脆壁克鲁维氏酵母、多形汉逊氏酵母、红酵母、酵母属酵母。

丝状真菌：蘑菇、曲霉、镰孢霉、青霉、肋状复膜孢糖酵母、*Trichosporon cutaneum*。

细菌：醋酸钙不动杆菌、纤维单胞菌、诺卡氏菌、甲基单胞菌、水气单胞菌、真氧产碱菌、分枝杆菌、*Spirulina maxima*、红假单胞菌。

在这些微生物群中，到目前为止酵母菌是最受关注的一类菌。

微生物种类的选择很大程度上取决于菌体能利用的基质或废料的类型。藻青菌中的螺旋藻（*Spirulina maxima*）可以生长在温度为30℃、pH为8.5～11.0且富含碳酸氢钠的浅水中。这种细菌在乍得共和国已被人们食用多年，可在池水中大量采集，晒干后供食用[35]。其它藻青菌（*cyanobacteria*）的生长需要光照、CO_2、矿物质、水和适宜的生长温度。但只有在纬度35°以下的地区才能大规模开发、利用这种作为SCP来源的菌体细胞，因为这些地区一年中的大部分时间光照充足[26]。

这些细菌、酵母和霉菌可以在各种基质中生长，包括食品加工处理后的一些废物（如奶酪乳清液、啤酒、土豆、罐头和咖啡加工后的废弃物）、工业废物（如造纸厂的亚硫酸盐废液和可燃气体）、纤维类废料（包括蔗渣、新闻纸造纸厂废料和大麦茎秆）。就利用纤维类废料而言，必须采用有分解利用纤维素能力的微生物菌种，如纤维单胞属菌或绿色木霉。采用纤维单胞菌和产碱杆菌混合培养技术分解纤维已取得成功。在利用淀粉类废料方面，采用肋状复膜孢糖酵母和产蛋白假丝酵母等假丝酵母混合培养分解技术也已投入应用，其中前者水解淀粉，后者以水解产物为代谢基质，生长出单细胞蛋白菌体。其它一些具代表性的基质和微生物列于表9.3中。

表9.3　　生产SCP中促进微生物生长的基质材料

基　质	微生物
CO_2和光照	粉核小球菌、*Scenedesmus quadricauda*、*Spirulina maxima*
n-烷烃、煤油	中间假丝酵母、介脂假丝酵母、热带假丝酵母、诺卡氏菌
甲烷	甲烷单胞菌、荚膜甲基球菌、木霉
H_2和CO_2	真氧产碱菌
汽油	醋酸钙不动杆菌、介脂假丝酵母
甲醇	甲烷单胞菌
乙醇	产蛋白假丝酵母、醋酸钙不动杆菌
亚硫酸盐废液	产蛋白假丝酵母
纤维素	纤维单胞菌、绿色木霉
淀粉	肋状复膜孢糖酵母
糖	产蛋白假丝酵母、啤酒酵母

9.11.3 SCP 产品

菌体细胞可直接作为动物饲料配方中的蛋白质成分来源，这样，原来作为动物饲料的一些食物，如玉米可以为人类所消费，或者作为人类食物中的蛋白质或其它食物成分的来源。SCP 在作为动物饲料或饲料添加剂的情况下，菌体干细胞无需进一步加工就可直接利用。至少在非洲的一部分地区，人们有食用螺旋藻的习惯。

就人类利用而言，最有可能的制品形式是 SCP 浓缩液或其分离蛋白，它们可以进一步加工成组织化或功能性 SCP 制品。生产功能性蛋白纤维时，将细胞进行机械破坏，离心除去细胞壁，将蛋白质从碎细胞中沉淀出来，所得的蛋白质经一类似注射器的小孔，将蛋白质注入诸如乙酸缓冲液、$HClO_4$、醋酸等基质中以形成组织化的蛋白产品。焙烤酵母蛋白就属于这类蛋白制品，在美国已批准作为人类食品配料。

9.11.4 SCP 的营养和安全性

已对来自不同微生物的 SCP 化学成分进行了分析[5,45]，分析和评价后人们发现：其氨基酸的组成和类型与动植物蛋白质相似。除某些 SCP 菌蛋氨酸含量偏低外，所有 SCP 菌的含氮量都相对较高。例如，以干重为基准的氮成分如下：细菌 12%～13%、酵母8%～9%、藻类 8%～10%、丝状真菌 5%～8%[21]。除蛋白质外，SCP 菌体还含有大量的碳水化合物、脂质和矿物质，同时它们还是 B 族维生素的极佳来源。脂肪含量因菌种不同而不同，其中以藻类细胞的脂肪含量为最高，细菌最低。以干重为基准，藻类的平均核酸含量为 3%～8%、酵母为 6%～12%、细菌为 8%～16%[21]。在所有 SCP 菌中 B 族维生素含量都很高。动物试验结果表明：SCP 的消化吸收率要低于诸如酪蛋白等动物蛋白。

用不同 SCP 产品喂养老鼠的研究已获成功，但除了某些酵母细胞产品外，人类食用 SCP 产品的研究却取得较少的成功。人们食用藻类和细菌 SCP 后普遍反映肠胃失调。食用 SCP 的有关问题可见有关的综述[45]。如果利用革兰氏阴性菌作为人类食用的 SCP 来源，必须设法去除其毒素或进行脱毒化处理。

SCP 中核酸含量较高是导致肾结石的形成和（或）中风的原因，细菌 SCP 的核酸含量可高达 16%，而推荐的日允许摄入量只有大约 2g。尿酸的积累是产生问题的原因。因为尿酸在细胞浆中几乎不溶。在核酸分解过程中释放嘌呤碱基和嘧啶碱基，腺嘌呤和鸟嘌呤代谢产生了尿酸。低等动物可将尿酸降解成可溶性的尿囊素化合物（它们可分泌尿激酶）。因此，与人类不同，对这些动物来说摄入大量核酸并不存在代谢问题。尽管在单细胞蛋白早期开发和利用过程中会出现核酸含量高这一问题，但利用一些特定的技术如酸沉淀、酸或碱水解、或利用内生和用牛胰脏提取的 RNAs 酶将这些化合物的含量降至低于 2%的水平还是可行的。

参 考 文 献

[1] Braun, P. and K. Fehlhaber. 1995. Migration of *Salmonella enteritidis* from the albumen into the egg yolk. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 95～99.

[2] Brooks, J., and H. P. Hale. 1959. The mechanical properties of the thick white of the hen's egg. *Biochem. Biophys. Acta* 32: 237～250.

[3] Casewell. M. W., J. E. Cooper, and M. Webster. 1981. Enteral feeds contaminated with *Enterobacter cloacae* as a cause of septicaemia. *Brit. Med. J.* 282: 973.

[4] Christiansen, L. N., and N. S. King. 1971. The microbial content of some salads and sandwiches at retail outlets. *J. Milk Food Technol.* 34: 289～293.

[5] Cooney, C. L., C. Rha, and S. R. Tannenbaum. 1980. Single-cell protein: Engineering, economics, and utilization in foods. *Adv. Food Res.* 26: 1～52.

[6] Curtis, P. A., K. E. Anderson, and F. T. Jones. 1995. Cryogenic gas for rapid cooling of commercially processed shell eggs before packaging. *J. Food Protect.* 58: 389～394.

[7] Fagerman, K. E., J. D. Paauw, M. A. McCamish, and R. E. Dean. 1984. Effects of time, temperature, and preservative on bacterial growth in enteral nutrient solutions. *Amer. J. Hosp. Pharm.* 41: 1122～1126.

[8] Fanelli, M. J., A. C. Peterson, and M. F. Gunderson. 1965. Microbiology of dehydrated soups. I. A survey. *Food Technol.* 19: 83～86.

[9] Fanelli, M. J., A. C. Peterson, and M. F. Gunderson, 1965. Microbiology of dehydrated soups. III. Bacteriological examination of rehydrated dry soup mixes. *Food Technol.* 19: 90～94.

[10] Fowler, J. L., and W. S. Clark, Jr. 1975. Microbiology of delicatessen salads. J. *Milk Food Technol.* 38: 146～149.

[11] Fowler, J. L., and J. F. Foster. 1976. A microbiological survey of three fresh green salads: Can guidelines be recommended for these foods? *J. Milk Food Technol.* 39: 111～113.

[12] Furtado, D., A. Parrish, and P. Beyer. 1980. Enteral nutrient solutions (ENS): In vitro growth supporting properties of ENS for bacteria. *J. Paren. Ent. Nutr.* 4: 594.

[13] Gill, K. J., and P. Gill. 1981. Contaminated enteral feeds. *Brit. Med. J.* 282: 1971.

[14] Gröschel, D. H. M. 1983. Infection control considerations in enteral feeding. *Nutr. Suppl. Serv.* 3 (6): 48～49.

[15] Harris, N. D., S. R. Martin, and L. Ellias. 1975. Bacteriological quality of selected delicatessen foods. *J. Milk Food Technol.* 38: 759～761.

[16] Hesseltine, C. W., R. R. Graves, R. Rogers, and H. R. Burmeister. 1969. Aerobic and facultative microflora of fresh and spoiled refrigerated dough products. *Appl. Microbiol.* 18: 848～853.

[17] Hostetler, C., T. O. Lipman, M. Geraghty, and R. H. Parker, 1982. Bacterial safety of reconstituted continuous drip tube feeding. *J. Paren. Ent. Nutr.* 6: 232～235.

[18] Julseth, R. M., and R. H. Deibel. 1974. Microbial profile of selected spices and herbs at import. *J. Milk Food Technol.* 37: 414～419.

[19] Kaferstein, F. K. 1976. The microflora of parsley. *J. Milk Food Technol.* 39: 837～840.

[20] Kereluk, K., and M. F. Gunderson. 1959. Studies on the bacteriological quality of frozen meat pies. I. Bacteriological survey of some commercially frozen meat pies. *Appl. Microbiol.* 7: 320～323.

[21] Kihlberg, R. 1972. The microbe as a source of food. *Ann. Rev. Microbiol.* 26: 427～166.

[22] Kneifel, W., and E. Berger. 1994. Microbiological criteria of random samples of spices and herbs retailed on the Austrian market. *J. Food Protect.* 57: 893～901.

[23] Kurtzman, C. P., R. Rogers, and C. W. Hesseltine. 1971. Microbiological spoilage of mayonnaise

and salad dressings. *Appl. Microbiol.* 21: 870～874.

[24] Leininger, H. V., L. R. Shelton, and K. H. Lewis. 1971. Microbiology of frozen cream-type pies, frozen cooked-peeled shrimp, and dry food-grade gelatin. *Food Technol.* 25: 224～229.

[25] Lifshitz, A., R. G. Baker, and H. B. Naylor. 1964. The relative importance of chicken egg exterior structures in resisting bacterial penetration. *J. Food Sci.* 29: 94～99.

[26] Litchfield, J. H. 1977. Single-cell proteins. *Food Technol.* 31 (5): 175～179.

[27] Litsky, W., I. S. Fagerson, and C. R. Fellers. 1957. A bacteriological survey of commercially frozen beef, poultry and tuna pies. *J. Milk Food Technol.* 20: 216～219.

[28] Muriana, P. M., and L. Kanach. 1995. Use of Nisaplin™ to inhibit spoilage bacteria in buttermilk ranch dressing. *J. Food Protect.* 58: 1109～1113.

[29] Nakamura, M., and K. D. Kelly. 1968. *Clostridium perfringens* in dehydrated soups and sauces. *J. Food Sci.* 33: 424～426.

[30] Pace, P. J. 1975. Bacteriological quality of delicatessen foods: Are standards needed? *J. Milk Food Technol.* 38: 347～353.

[31] Paradis, D. C., and M. E. Stiles. 1978. A study of microbial quality of vacuum packaged, sliced bologna. *J. Food Protect.* 41: 811～815.

[32] Pederson, C. S. 1930. Bacterial spoilage of a thousand island dressing. *J. Bacteriol.* 20: 99～106.

[33] Powers, E. M., C. Ay, H. M. El-Bisi, and D. B. Rowley. 1971. Bacteriology of dehydrated space foods. *Appl. Microbiol.* 22: 441～445.

[34] Powers, E. M., T. G. Latt, and T. Brown. 1976. Incidence and levels of *Bacillus cereus* in processed spices. *J. Milk Food Technol.* 39: 668～670.

[35] Powers, E. M., R. Lawyer, and Y. Masuoka. 1975. Microbiology of processed spices. *J. Milk Food Technol.* 38: 683～687.

[36] Rehberger, T. G., L. A. Wilson, and B. A. Glatz. 1984. Microbiological quality of commercial tofu. *J. Food Protect.* 47: 177～181.

[37] Schmidl, M. K., and T. P. Labuza. 1992 Medical foods. *Food Technol.* 46 (4): 87～96.

[38] Smittle, R. B. 1977. Microbiology of mayonnaise and salad dressing: A review. *J. Food Protect.* 10: 415～422.

[39] Snyder, H. E. 1970. Microbial sources of protein. *Adv. Food Res.* 18: 85～140.

[40] Surkiewicz, B. F. 1966. Bacteriological survey of the frozen prepared foods industry. *Appl. Microbiol.* 14: 21～26.

[41] Surkiewicz, B. F., R. J. Groomes, and A. P. Padron. 1967. Bacteriological survey of the frozen prepared foods industry. III. Potato products. *Appl. Microbiol.* 15: 1324～1331.

[42] Swartzentruber, A., A. H. Schwab, B. A. Wentz, A. P. Duran, and R. B. Read, Jr. 1984. Microbiological quality of biscuit dough, snack cakes and soy protein meat extender. *J. Food Protect.* 47: 467～470.

[43] Todd, E. C. D., G. A. Jarvis, K. F. Weiss, G. W. Riedel, and S. Charbonneau. 1983. Microbiological quality of frozen cream type pies sold in Canada. *J. Food Protect.* 46: 34～40.

[44] Tranter, H. S., and R. G. Board. 1984. The influence of incubation temperature and pH on the antimicrobial properties of hen egg albumen. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 53～61.

[45] Waslien, C. I. 1976. Unusual sources of proteins for man. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.*

6: 77～131.

[46] Watt, B. K., and A. L. Merrill. 1950. Composition of foods —raw; processed. prepared. *Agricultural Handbook No.* 8, Washington, DC: USDA.

[47] Wentz, B. A., A. P. Duran, A. Swartzentruber, A. B. Schwab, and R. B. Read, Jr. 1984. Microbiological quality of frozen breaded onion rings and tuna pot pies. *J. Food Protect.*

第四部分　食品中微生物及其产物的鉴定

如果人们认为科学学科与其方法学没有什么区别，那么在本部分 10～12 中我们将对食品微生物学方法学作详细介绍。在第 10 和 11 中，将讲述传统方法和一些更准确快速的方法。在此领域，正进行更深一步的实验研究。下面的参考资料中对此有更深的论述。

在 12 中介绍的动物和组织培养方法为生物分析方法奠定了基础。关于食品中的病原体，我们将在第七部分进行论述。

以下的参考资料对本部分的内容有更深的论述：

King，A. D.，Jr.，J. I. Pitt，L. R. Beuchat，and J. E. L. Corry. 1986. 《*Methods for the Mycological Examination of Food*》New York. Plenum. 这本书详细讲述了检测食品中真菌的许多方法。

Nelson，W. H. 1991《*Physical Methods for Microorganisms Detection*》Boca Raton，FL：CRC Press. 书中详细介绍了 ATP 分析方法检测微生物。

Ray，B.，ed. 1989.《*Injured Index and Pathogenic Bacteria：Occurrence and Detection in Feeds*》Boca Raton. FL：CRC Press. 文中包括了代谢中感染的微生物以及从食品中检测的方法，重点在于病原体和指示物。

Swaminathan，B. and P. Feng. 1994.《*Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria*》Ann. Rev. Microbiol. 48：401-26 文中介绍了现今许多实用的快速方法。

10. 培养、显微观测和取样方法

对于食品中微生物及其产物的存在、类型和数量的检测是食品微生物学的基础。尽管这一方面十分重要，但至今仍没有一种常用的方法可检测得到食品中微生物的精确数量。虽然有一些方法较好，但在使用每一种时都会有一定的局限。

检测食品中微生物总数的四种方法如下：

(1) 活性细胞的标准平板计数法（SPC）

(2) 各种细胞的统计学检测法即最近似数测定方法（MPN）

(3) 染色还原技术估算具有还原能力的各种细胞的总数

(4) 活性和非活性细胞的直接显微计数法

本部分对上述方法及其在各种原料中检测微生物方面的应用将进行讨论。表 10.1 中

的文献中对其用途有详细介绍。另外，在此介绍各种检测表面无的基本方法、方法的总结以及如何试图提高其使用效果。

表 10.1　　一些有关食品微生物分析方法的文献

	参考文献							
	64	12	71	65	121	72	30	81
直接显微记数法				×	×	×	×	×
标准平板记数法			×	×	×		×	×
最近似数法			×	×	×		×	×
染色还原法				×				
大肠杆菌			×	×	×		×	×
真菌		×			×		×	×
荧光抗体法					×		×	×
取样方法			×		×	×	×	
寄生物	×							

10.1　传统的 SPC 方法

在 SPC 法活性细胞的标准平板计数法中，将部分样品取出混合均匀，用适当的稀释液进行梯度稀释、涂布或浇注琼脂平板。在合适温度下培养一定时间，然后通过电子计数器或 Queber 对所有可见菌落进行计数。

SPC 是食品工业中检测食品中活性细胞或菌落形成单位(cfu)数量的最常用的方法。当记录食品中总的活性细胞数目时，要考虑下面一些因素：

(1) 采用的取样方法

(2) 微生物在样品中的分布情况

(3) 食品中生物群的特性

(4) 食品原料的特性

(5) 食品的预检过程

(6) 所用培养基的营养情况

(7) 培养温度和时间

(8) 培养基的 pH，A_w 和氧化还原电势 (Eh)

(9) 稀释剂的类型

(10) 食品样品中的相对数量

(11) 其他竞争性或拮抗微生物的存在

除了提及的限制因素外，菌株的培养还受到所用试剂的影响和限制。

尽管 SPC 大多采用倾注平板的方法，但涂布平板方法会取得更好的结果。涂布平板方法是先将琼脂倒在平板上待其凝固后再使用，将一系列的稀释液涂布于同样的平板表面，准确吸取 0.1mL 的稀释液于每一平板中，用涂布棒在整个平板上均匀进行涂布。涂布平板方法的优点在于可检测到热敏性菌体，而在倾注平板方法中，这些微生物在熔融

的琼脂培养基中则不能生长。如果菌落形态对于单菌落的鉴定十分重要时，应选择涂布平板方法。显然，对严格好氧菌应该使用此方法，但对微好氧微生物则其生长会较缓慢。涂布方法的主要缺点是涂布物问题（特别是涂布时琼脂表面还不干燥的情况下）和菌落重叠混杂的问题。

10.1.1 食品样品的均匀混合

在 20 世纪 70 年代以前，人们常用机械混合器从食品样品中提取微生物（Waring type）。1971 年，在英国，Sharpe 和 Jackson 创造了 Colwell Stomacher 方法[105]，许多实验室使用这一设备来对微生物计数的食品样品的进行均匀混合。此设备较为简单，样品放入塑料袋中，由两个桨叶剧烈搅拌。捣碎对样品产生剪切力，微生物则分散于稀释液中。此设备有三种型号，其中 400 型在实验室中应用的最为广泛。它可以处理 40～400mL 的样品。

在 Stomacher 中安装高速搅拌桨叶，以适用于对大批量食品的分析。Stomacher 处理的样品与搅拌器处理的样品用平板计数结果相似。此设备优于搅拌器的原因为：

①不用清洗和保管搅拌容器；

②在通常操作时间（2min）内不会升温；

③混合液可放入 Stomacher 袋中，置于冷冻器内备用；

④机器的噪音低于搅拌机。

Sharpe 和 Harshman[104]在研究中发现：Stomacher 对金黄色葡萄球菌、粪肠球菌和大肠杆菌的杀伤性要低于搅拌机，还有调查表明：使用 Stomacher 计数结果比搅拌机更精确[120]，但也有调查表明搅拌机的准确性高于 Stomacher[72]，而且 Stomacher 仅适用于特殊的食品，只对一些食品的使用效果较好。另一项研究结果表明，使用 Stomacher，搅拌机和振荡机的计数结果没有太大差别，但 Stomacher 对革兰氏阴性菌的计数量高于其余两者[56]。

Stomacher 优于搅拌机的另一特点是能够用于染色-还原实验所用的肉制品的混匀。Holley 等人[48]指出：使用 Stomacher 从肉制品中提取细菌不会损坏肉的组织，并且对刃天青还原的还原物质的干扰较少，但使用搅拌机后，会使还原物质增多，从而导致刃天青的还原结果没有意义。

10.1.2 旋转平板法

旋转平板是一种将液体接种物涂布在旋转的平板上，平板中已注入培养基并已凝固。散布器从平板中心移至外围，将样品涂布在阿基米德旋转平板上。所附备的特殊注射器不断增加散布样品的体积数量，使得在一个平板上的浓度范围达到 10 000∶1，在适当温度下培养，平板中心的菌落浓度较高，边缘的浓度较低。

通过一种特殊的格状计数器对旋转平板的菌落进行计数，如图 10.1A 所示，出现在网格区域的菌落被计数。图 10.1B 中所示的旋转平板在图 10.1C 中表示了相应的菌落数。在此例中总的样品体积为 0.0018mL，两个网格计数分别为 44 和 63 个菌落，总的菌落数为 6.1×10^4 个/mL。

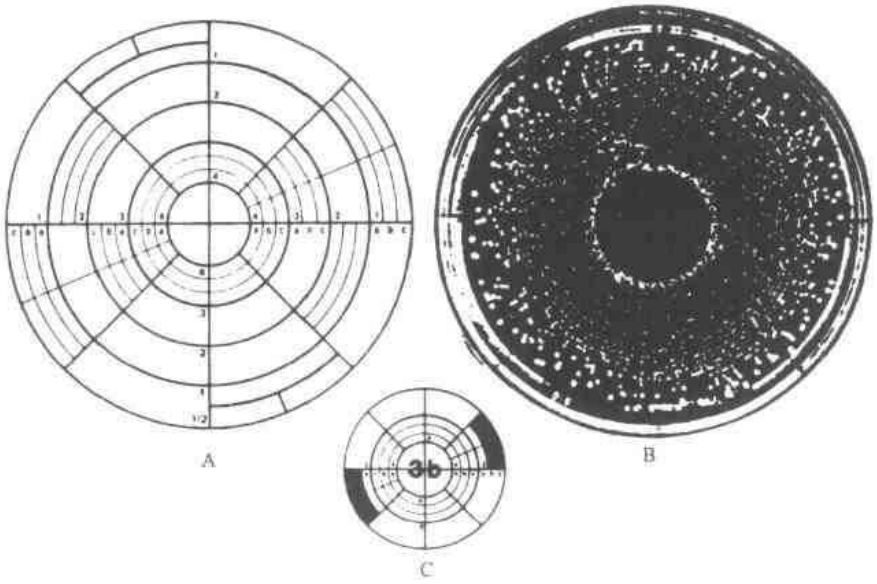


图 10.1　旋转平板的特殊计数网格（A）；
旋转平板上生长的菌落（B）；旋转平板的区域（C）
注：在此例子中，接种量为 0.0018mL，所示两个计数区域为 44 和 63，
得到的平均计数量为 6.1×10^4 个/mL。

这里所讲述的旋转平板设备是 Gilchrist 等人所设计[38]，其原理早在 Reyniers[96]和 Trotman[119]的研究中就已经介绍了。大量的研究者对此方法进行了研究，并与其他的活性菌落计数法进行了比较。使用 201 种原料样品和巴氏消毒牛乳做实验，将此方法与 SCP 相比较，全部得到较相似的结果[26]。在 6 种牛乳样品的分析中均显示旋转平板法结果与 SCP 方法相似。旋转平板法的标准偏差为 0.109，SPEC 方法[86]为 0.110。在另一实验中，旋转平板法与其他三种方法（倾注法、平板涂布法、微量计数法）相比，结果偏差在 5% 以内。还有实验中显示旋转平板法与微量计数法结果相同[45]。旋转平板法已成为美国公职分析化学师协会（AOAC）认可的方法。

旋转平板计数法比标准培养法的优越性在于：所用的琼脂少；所需的培养皿、稀释液空白、吸管要少；每小时可检测的样品为后者的 3～4 倍[62]。每小时可涂布 50～60 个平板，且操作中不需调试[55]。此方法的缺点是：食品样品中的颗粒可能会使注射器的针头堵塞。因此，此方法更适用于牛乳等液体食品。激光计数器已在此方法中应用。由于设备较贵，在进行少量样品分析的实验室中则不会使用。在《细菌学分析手册》中对旋转平板法有更详细介绍[30]。

10.2　膜过滤

由于过滤膜的孔径通常为 0.45μm，因此水和溶质可以通过膜而细菌则不能通过膜。将一定体积的样品经膜过滤后收集菌体，再将膜放在琼脂平板或充满选择性培养基的吸

收垫上进行培养。对生长出的菌落进行计数，或进行 DMC 计数。在计数时，膜经过适当染色、冲洗和处理，能够使菌体显微观察更清晰可见。这一方法特别适用于含菌数少的液体样品。尽管较多的水经过膜时不会造成膜的堵塞，但一张膜仅能过滤少量食品样品的匀液。

荧光染色方法的引入，使膜过滤-DMC 微生物菌落计数的效率大大提高。早在 20 世纪 80 年代，荧光染色和上荧光染色技术就得到了广泛的应用。最早使用的是纤维膜，后来是聚碳酸酯核孔膜，它可将所有细菌滞留在膜上。当使用这两种膜对湖水和海水进行过滤后的计数时，核孔膜的计数结果为纤维膜的两倍[46]。

10.2.1 直接上荧光膜技术

膜技术是建立在基础技术的基础上改进提高的方法。直接荧光膜技术（DEFT）是将荧光染色与荧光显微技术结合[46]，是一种快速的食品微生物检测技术。如用 5μm 尼龙膜过滤食品样品液，滤出液用 2mL 氚 X-100 和 0.5mL 胰岛素处理，胰岛素用于溶解肉体细胞，防止膜被堵塞。经一段时间的培养后，处理的滤出液经 0.6μm 的核孔聚碳酸酯膜过滤，然后滤膜用吖啶橙进行染色，对染色后的菌体进行荧光显微技术计数，将显微计数器每一区域的平均数量相加得到每克细胞数。25～30min 内就可得到结果，用此方法肉类和乳制品中的微生物数量为 6000cfu/g。

DEFT 应用于乳制品计数[89]，其结果与 APC 方法和培养直接微生物计数方法相似，结果在 5×10^3～5×10^5 个/mL 之间。此方法可在 10min 内检测计数乳制品中的活性革兰氏阴性菌和全部革兰氏阳性菌。20min 内可计数经热处理的乳制品中微生物，数量少至 5700 个/mL。经过 6 次实验比较 DEFT 和好氧平板培养计数法（APC），相关系数为 0.9，但 DEFT 的实验重合性比 APC 方法差 1.5 倍，其实验再现性仅为 APC 的 3 倍[88]。经处理过滤后的固体食品也可用 DEFT 方法计数微生物，可计数<60 000 个/g[91]。DEFT 已成功用于肉类食品中微生物的计数[111]和食品接触面的微生物计数[47]。在参考文献[87]中有详细介绍。

10.2.2 DEFT-微菌落计数

DEFT 可用于细胞的直接显微检测，DEFT-微菌落计数法仅用于活性细胞的检测。食品匀液经 DEFT 膜过滤，膜放在培养基表面，恒温培养至微菌落长出。革兰氏阴性菌培养 3h，革兰氏阳性菌培养 6h[98]。生长的微菌落必须用显微镜观察。在 8h 内可检测到大肠杆菌、假单胞菌和葡萄球菌，数量少至 10^3/g[98]。

另一个改变是微菌落上荧光显微技术，它是将 DEFT 和防水网格过滤膜技术（HGMF）相结合[97]。在此方法中，样品经非酶清洁剂处理后，通过核孔聚碳酸酯膜过滤，膜被放入选择性琼脂培养基表面培养，和 DEFT 微菌落技术一样，革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌分别培养 3h 和 6h。膜用吖啶橙染色，通过上荧光显微技术进行微生物计数。如被损害细胞不经修复，此方法大约在 6h 内就可得到结果，如添加细胞修复步骤，则需要 12h 才能完成[73]。

10.2.3 防水网格过滤膜过滤技术

防水网格过滤膜技术是 Sharpe 和 Michaud[108,110]所发明，可用于各种食品中的微生物检测计数。此方法中所用的膜为特殊的含有 1600 个蜡质网格的防水膜，每一个格中限制微生物的生长和菌落大小。每一个膜可通过 MPN 自动计数，计数范围为（10～9）×10⁵ 个[17]。此方法可检测的最少细胞数为 10 个/g，在 24h 内可得到结果[107]，可用于所有 cfu 的检测，也可用于特殊微生物，如指示性微生物[15,18,18]，假单胞菌[59]、沙门氏菌[27]和真菌[16]。它已经 AOAC 许可用于总的大肠杆菌、粪便大肠杆菌、沙门氏菌、酵母菌和霉菌的计数。在真菌 ISO-GRID 方法中，使用特殊的培养基，含有两种抗细菌抗生素和台盼蓝。后者使真菌菌落具有蓝色，在 48h 内可检测的最少数量为 10cfu。

1mL 的 1∶10 样品处理匀液经过滤膜过滤，然后将膜置于琼脂培养基表面恒温过夜培养，使菌落生长。用 MPN 方法计数，统计含有菌落的网格。此方法，每个膜可以过滤 1g 食品样品[108]。

将 5 个试管样品中的大肠杆菌用 MPN 和 HGMF 分别计数，能够得到相似的结果[17]。在实验中，HGMF 膜被放入胰酶解酪蛋白-黄豆琼脂培养基上，在 35℃下培养 4～5h（目的是细胞修复），然后移入 m-FC 琼脂培养基再培养。用于食品中 0157∶H7 大肠杆菌菌株（出血性结肠炎菌，HC 菌）检测的酶标记抗体（ELA）处理技术得到发展[1,17]，酶标记抗体（ELA）处理技术是以 HGMF 为基础的。此方法使用了特殊的琼脂培养基，使 HC 菌株在 44.5℃生长。在特殊培养基中仅含有 0.113%的胆汁盐，而 HC 琼脂培养基中含有 0.15%。此方法可检测牛肉中 90%的 HC 菌株[115]。HGMF ELA 方法使用 HC 琼脂基，在 43℃恒温培养 16h，然后从膜上将生长菌落洗下，将膜浸入辣根过氧化酶蛋白单菌落抗体系统中。此方法，ELA 菌株呈紫色，在 24h 内可检测得到 95%的 HC 菌株，最小检测量为 10HC 菌株/g 肉制品。

10.3 显微镜菌落计数法

显微镜菌落计数是对生长在载玻片上琼脂培养基的微菌落进行计数。首先进行涂片，将 0.1mL 牛乳和琼脂的混合物涂布在 4cm² 的载玻片上。然后，恒温培养，干燥，染色，最后用显微镜计数微菌落。

在另一方法中，将 2mL 熔融琼脂与 2mL 热牛乳混合，取 0.1mL 涂布在 4cm² 的载玻片上。经硫胺素蓝染色后，用 16mm 物镜的宽视野显微镜观察载玻片。

10.4 琼脂滴计数法

在 Sharpe 和 Kilsby[106]发明的琼脂滴计数法中，食品的匀液样品在装有熔融琼脂（45℃）的试管中稀释。每一个食品样品使用 3 个装有琼脂的试管，第一个试管中加入 1mL 的样品。混匀后，取一灭菌的毛细吸管（最好一滴为 0.033mL），吸取 0.1mL 液体加入一空的有盖培养皿的底部，重复 5 次，并使 5 滴液体成行排列。再用同一个吸管在

第 1 个试管中吸取 3 滴液体，即 1mL，加入第 2 个试管中，混匀后，如上操作，5 滴液体排成行与第一行相邻。然后重复操作第 3 个试管。含有琼脂滴的培养皿恒温培养 24h，然后用 10 倍目镜观察微菌落。使用此方法可检测纯培养物、蔬菜和肉食中的微生物。采用琼脂滴计数法对肉食中的微生物进行计数，结果稍高于传统培养计数法。但是此方法较快，24h 恒温培养的菌落数与传统培养 48h 的结果相同。并且此方法不需要空白稀释液，每一个样品仅使用一个培养皿。

10.5 干燥薄膜计数法

干燥膜计数法是 3M 公司创立发展起来的，并且设计了 Petrifilm 膜。在该方法中，将两个塑料薄膜粘在一起，在一边膜上涂布培养基成分和溶于冷水的凝胶剂。此方法可以使用非选择性培养基，并进行好氧培养计数 (APCs)，若使用选择性培养基，则可检测特殊菌群。此方法是一种标准微生物计数法，已经得到了 AOAC 的认可。

使用时，在两个薄膜中间滴加 1mL 的稀释液，通过挤压将液体分布在营养区。恒温培养后，非选择性培养薄膜的生长菌落呈红色，因为在营养阶段有四唑染料存在。Petrifilm 方法除了可以使用 APC 以外，还可检测特殊的菌群，如大肠杆菌。用 APC 检测 108 种牛乳样品发现干燥薄膜计数法与传统培养方法密切相关，并且是一种较适用的方法[139]。在一实验中，将此方法与紫红胆汁琼脂 (VRBA) 方法和 MPN 方法相比，分别对 120 种牛乳样品进行检测，计数其中的大肠杆菌，Petrifilm-VRB 方法与两者的检测结果相似[76]。一种干燥培养基大肠杆菌计数方法得到改进，它是采用 β-葡糖苷酸酶作为基质，使大肠杆菌菌落周围呈蓝色晕圈与其它菌落相区别开来。与 MPN 和 VRBA 方法相比，干燥培养基大肠杆菌计数方法可得到相似的结果[67]。

10.6 最近似数测定法

在此方法中，食品样品的稀释与 SPC 方法相同。3 试管和 5 试管方法中分别将 3 个稀释梯度的稀释液接入 9 个和 15 个装有培养基的试管中。使用标准 MPN 表就可得到原样品中微生物数量。此方法实质为统计学方法，结果高于 SPC。

在 1915 年，McCrady 发明了此方法。它并不是一种精确的分析方法，3 试管方法的 95% 的置信度范围为 21～395。在 3 试管实验中，62 个实验组合中有 20 个占全部实验结果的 99%，而在 5 试管实验中，214 个实验组合中有 49 个占全部实验结果的 99%[122]。在食品中大肠杆菌浓度的研究中发现 10 个 3 试管实验的 MPN 值中最高为 32，而在另一研究中发现最高临界值为 60[112]。尽管 Woodward[122] 总结得到许多的 MPN 结果是不准确的，但这一方法还是被普遍应用。主要原因是：

①此方法相对简单；

②不同实验室中得到的实验结果与 SPC 相比，相似率较高；

③使用适当的选择性培养基可检测特殊的微生物菌群；

④它是一种用于测定粪便中大肠杆菌数量的方法。

此方法的缺点是需要大量的玻璃器皿（特别是 5 试管实验）；不能观察微生物菌落的形态；准确性不高。

10.7 染色还原计数法

在估算样品中活性微生物数量的过程中使用两种染料——亚甲基蓝和刃天青。染色还原实验中，在样品的上清液中添加任一种染料的标准溶液，添加亚甲基蓝从蓝色还原为白色；添加刃天青从暗蓝色还原为粉红色或白色。染色还原的时间与样品中的微生物浓度成反比。

人们对 100 种牛乳样品进行了亚甲基蓝和刃天青的还原研究；除了两个例外，其它细菌的数量和还原时间都很一致[37]。在牛肉腐败菌的快速检测中，使用刃天青还原至无色，进行气味检测，SPC 检测[102]。染色还原实验中存在的问题是一些食品中存在一些还原物质。对生肉制品的检测会出现此类问题，Austin 和 Thomas[9]发现熟肉制品的检测中刃天青还原方法其效果比生肉制品好。在大约 600 个熟肉制品的检测中，在塑料袋中的切片熟肉每 100g 添加 20mL 0.0001%的刃天青溶液，检测结果很成功。有一种避免食品中还原物质的方法，是将鲜肉样品经 Stomacher 混匀，而不是用 Waring 搅拌器，当生肉制品经 Stomacher 混匀后，添加含 10%脱乳清牛乳的刃天青溶液，可以得到很好的还原效果[48]。在 Stomacher 处理的样品中被破坏的组织较少，还原物质的浓度较低。由 Holley 等人发明的方法得到了 Dodsworth 和 Kempton 的评价[25]，实验发现：SPC>10^7 个/g 的鲜肉制品中微生物的检测在 2h 内可以完成。与硝基蓝四唑（NT）和印度硝基苯四唑（INT）相比，刃天青还原更快。取自绵羊骨架的表面样品，刃天青 30min 可被 18 000cfu/m^2 菌所还原；NT 在 600min 可被 21 000cfu/m^2 还原；INT660min 可被 18 000cfu/m^2还原[95]。对 389 种冷冻豌豆样品分别使用亚甲基蓝还原和 APC 技术分析，结果前者与 APC 成线性关系，范围为 lg2～lg6cfu。脱色时间分别为 8h（10^5cfu/g）和 11h（10^4cfu/g）[11]。

染色还原技术很早就应用于乳品工业中用来检测原料牛乳中的微生物质量。它的优点是简便、快捷和经济，并且只有活细胞对染料有还原能力。其缺点是所有的微生物对染料的还原能力都不相同，因此它不适用于含有还原酶的食品，除非经过特殊的处理。在第四部分 11 中将讨论食品微生物学中发光和发色物质的应用。

10.8 滚动试管计数法

本方法需要使用带有螺旋盖的各种大小的试管或瓶子。在试管中事先加入一定量的接种的熔融琼脂，使其凝固在容器底部形成薄层，然后恒温培养，通过旋转试管进行微生物菌落计数。此方法适用于厌氧菌的计数。在 Anderson 和 Fung[3]中对此方法有详细介绍。

10.9 显微直接计数法

在显微直接计数法（DMC）中最简单的方法是将样品涂布于载玻片上，用适当染料染色，然后油镜观察，计数。DMC 方法广泛应用于乳制品工业，分析牛乳等食品的微生物质量。R. S. Breed 又改进了这个特殊技术。简单地讲，此方法是将 0.001mL 的样品涂布在 1cm² 的载玻片上，然后固定、除油、染色后，对微生物进行计数。计数时使用校准过的显微镜[65]。此方法还可用于其它食品的微生物检测，如干燥食品和冷冻食品。

DMC 方法的优点是快捷、简便，能对细胞形态进行分析，还可使用荧光技术增强其效果。其缺点在于由于是显微技术，容易造成操作人员的疲劳；活性和非活性细胞均被计数；食品颗粒与细胞不易区分；微生物细胞不易分散均匀。一些细胞不能被计数；DMC 方法的计数结果总是比 SPC 方法要高。尽管存在这些缺点，DMC 方法仍然是食品微生物最快的分析方法。

一种检测和计数活性细胞的载玻片方法得到了发展与改进[11]。在这些方法中使用了四唑盐，即 2（*p* 碘苯基-3-*p*-硝基苯基）-5-苯基氯化唑（INT）。细胞暴露于经过滤消毒的 INT 中在 37℃条件下水浴 10min，然后经 0.45μm 的膜过滤。滤膜在 50℃干燥 10min，用棉子油覆盖再观察。此方法适用于细菌和酵母的纯培养物，但当用于牛乳的分析时，则不如 APC 方法的效果好。当使用荧光显微镜和 Viablue（修饰后的苯胺蓝氟化铬）时，活性酵母细胞与非活性细胞有所不同[54,60]。活性细胞经吖啶橙（0.01%）染色后，用荧光显微镜观察可看到橘红色荧光。这就是吖啶橙直接计数法（AODC）的原理。

10.10 霍华德霉菌计数法

这是 1911 年 B. J. Howard 在检测番茄食品时使用的一种载玻片法。此方法需要使用一种特殊的载玻片以观察霉菌菌丝体。方法不适用于被粉碎的番茄食品。在 AOAC 中，对与霍华德方法相似的检测罐装饮料和水果中的 Geotrichum candidum 的方法以及霍华德方法进行了全面的介绍[81]。DEFT 方法也可用于蒸汽消毒和未经蒸汽消毒的番茄食品的检测，它可代替霍华德霉菌计数法[42]。

10.11 表层微生物的检测

确保食品表面卫生的标准显然是十分重要的。检测食品表面的主要问题是分离食品和用具表面的主要微生物群。但是，一种方法并不适合用于所有的微生物。食品加工厂一直使用某一确定的方法，最后他们意识到了这一问题。下面将对食品加工常用的一些食品表面检测技术进行介绍。

10.11.1 棉拭和棉拭水方法

棉拭方法是表面微生物检测中应用最广泛、最古老的方法，它不仅用在食品以及乳

品工业，而且还应用于医院和旅馆。W. A. Manheimer 和 T. Ybanez 进一步研制出棉拭水技术。此方法，需要使用棉花或藻蛋白酸钙。在检测一定区域的表面时，可以使用开口模板限定冲洗区域，如 1cm²。将灭菌后的模板置于检测表面，暴露出的表面用潮湿的清洗物彻底擦拭。然后将清洗物放入装有稀释液的试管中，在冰箱中贮存，必要时在稀释液中添加中和剂。当使用棉花做清洁物时，微生物必须从纤维中分离出来。当使用藻蛋白酸钙做清洁物时，用六甲基磷酸钠将藻蛋白酸盐进行溶解，使微生物悬浮于稀释液中。在稀释液中的微生物通过适当方法如 SPC 法进行计数，有时对特殊菌群检测时需使用选择性培养基。Koller[61]对棉拭水方法进行了改进，在检测平面添加 1.5mL 的溶液，在 3cm 区域内棉拭 15s，用微升吸管吸取 0.1mL 和 0.5mL。所吸取的溶液用涂布平板或倾注平板的方法进行计数。

比较棉花和藻蛋白酸钙的清洗效果，人们发现使用藻蛋白酸钙可以得到更多的微生物数量。通过棉拭方法，一些研究者发现牛骨架表面存在 10%的微生物[74]，在不锈钢工具表面有 47%的枯草芽孢杆菌[7]，在鲜肉表面有 79%的微生物[19,85]。牛骨架的棉拭方法检测结果是平板方法的 100 倍，偏差率也很低[79]。棉拭方法非常适用于柔软、粗糙、污染严重的表面。微生物是否容易除去主要决定于表面的结构和质地以及微生物的类型。虽然在某些方面还存在一定的限制，但棉拭水方法仍是用于食品和工具表面微生物分析的简单、快捷、经济的方法。

棉拭之后，在 2～5min 内 ATP 分析系统的使用可检测细胞的存在，能够用于快速在线检测。虽然 ATP 分析系统提供的方法对细菌其特意性不高，但是该方法对于了解食品表面细胞污染程度是很有价值的，也可相当有效的分析各种清洗方法的效率。ATP 分析的详细资料将在本书 11 中介绍。

10.11.2 平板接触培养方法

直接平板接触复制微生物方法使用特殊的平板，在平板中倾注 15.5～16.5mL 的培养基，形成琼脂平面。当平板翻转时，待检表面与琼脂平面接触。此方法由 Gunderson 和 Gunderson 在 1945 年提出，在 1964 年得到 Hall 和 Hartnett 的改进发展。当检测经清洗剂清洗后的表面时，培养基中需添加中和剂（卵磷脂，吐温 80 等）。与检测表面接触后，培养皿盖盖，恒温培养，然后菌落计数。

此方法中最明显的缺点在于它仅适用于微生物较分散的表面，而对于污染严重的表面效果不好。使用干燥的琼脂表面和选择性培养基可以减少这种缺点[24]。当检测表面较光滑、坚硬和无孔隙时，可以使用 RODAC 平板[7,79]方法。尽管此方法不适用于污染严重的表面，但它可以估计到污染表面的液体中至少要含有 10 个/mL 微生物，才能被棉试方法和平板接触方法检测到[79]。研究者发现平板接触仅能除去表面微生物的 0.1%。这表明如果此方法得到的结果为 10cfu/cm²，实际结果应为 10^4cfu/cm²。当不锈钢表面被枯草芽孢杆菌污染时，使用 RODAC 方法只发现有 41%的微生物，而棉拭方法能发现 47%的微生物[7]。当每 21～25cm² 的表面污染有 100 或更多微生物时，棉拭方法比平板接触方法检测效果好[103]。当污染数量少时，平板接触方法较好。

10.11.3 注射琼脂与“琼脂肠”方法

W. Litsky 于 1955 年提出了琼脂注射方法，以后又进一步进行了改进[6]。此方法是将 100mL 的注射器除去针头，在其圆柱形空管中装满琼脂。通过挤压活塞将琼脂涂布在检测表面。再将琼脂层切下，放入培养皿中培养，菌落计数。由 Ten Cate[116]提出的“琼脂肠”方法与之相似，但使用的是塑料管而不是经改造的注射器。欧洲的研究者大多使用“琼脂肠”方法检测鲜肉表面和工具表面。这两种方法均是由 RODAC 方法的演变而来的，所以都有同样的缺点，就是只限用于污染少的表面。因为微生物团可能只形成一个菌落，这些方法的检测结果通常低于那些能将菌团打散的方法。

在检测鲜肉表面时，Nortje 等人[80]比较了三种方法：两次棉拭方法、切除方法、“琼脂肠”方法。尽管切除方法是三种方法中最可靠的，但“琼脂肠”方法与其结果相近，又由于它简单、快捷，研究者推荐使用此方法。

10.11.4 其他表面分析方法

10.11.4.1 直接表面分析方法

许多研究者采用直接表面琼脂培养方法，此方法将熔融琼脂倾注于检测表面。凝固后琼脂层被放入培养皿中培养。Angelotti 和 Foter[6]推荐此方法为表面分析方法，它适用于表面活性微生物的检测[29]。此方法已成功用于不锈钢表面对生孢梭菌的内生芽孢的检测[75]。尽管它是一种有效的研究方法，但并不作为食品厂的常规方法。

10.11.4.2 黏性薄膜方法

Thomas 发明的黏性薄膜方法已经由 Mossel 等人成功应用[74]。此方法将黏性薄膜贴在检测表面，暴露的一面贴于琼脂平板。在检测木质表面时，此方法与棉拭方法相比效果较差[74]。一种黏性带方法用来对鲜肉的表面进行分析效果较好[35]。在最近的研究中，在检测猪肉时将 RODAC 方法、棉拭方法和黏性带方法(Mylar)进行了比较，黏性带和 RODAC 的相关性要强于黏性带和棉拭方法，也要强于 RODAC 和棉拭方法的相关性[22]。带有培养基的塑料条可用于瓶子表面的微生物检测[28]。

10.11.4.3 棉拭与琼脂斜面

1962 年 N. H. Hansen 提出的棉拭与琼脂斜面方法被欧洲的一些研究者成功使用。此方法采用棉花取样，直接接种于斜面。恒温培养，斜面分组为 lg 菌落数量的一半。通过在纸上标绘分散菌落来计数微生物菌落数量。Qlgaard[82]提出了与此相似的方法，清洗物/琼脂平板方法。它需要模板，培养皿，参考表格，比其它方法更为复杂。

10.11.4.4 超声仪

超声仪被用于表面污染微生物的检测，但是测试的表面必须足够小且可以移动，以保证测试而可装入容器中浸没在液体中。当容器放入超声仪中，能量使微生物分散到液体中。棉拭水方法可利用超声能量除去棉花中的微生物[94]。

10.11.4.5 撒布枪

由 Clark[19,20]设计的撒布枪方法，是将冲洗液撒布在检测表面，然后将液体接种平板上。尽管设备较为轻便，但需要提供空气压力。在除去鲜肉表面的微生物时，此方法比

棉拭方法更有效。

10.12　代谢受破坏的微生物

当微生物受到环境的影响，如亚致死高温和冷冻，许多细胞的代谢就会受到破坏，结果在选择性培养基上不能形成菌落。鉴定微生物的代谢是否被破坏，可将样品涂布在选择性和非选择性培养基上，恒温培养后菌落计数。在非选择性培养基上受破坏菌体和没有受破坏菌体都可生长，而在选择性培养基上只有没受破坏的菌体可以生长。两种培养基上微生物的数量差即为受破坏的菌体数。在图10.2中阐明了受亚致死高温影响的金黄色葡萄球菌的数据及其原理[118]。研究者将微生物放入52℃的磷酸盐缓冲液中（pH7.2），处理15min使细胞受到损伤。将在0时刻的细胞数与加热15min的在非选择性胰酶解酪蛋白黄豆培养基（TSA）和选择性培养基TSA＋7.0%NaCl（TSAS）中生长的菌落数进行比较，可以发现，TSA上的菌落数有微小变化，而TSAS上的菌落数大大降低，表明细胞受损数量与盐浓度有关。将受损细胞放入营养肉汤中37℃恒温培养4h，使细胞恢复。培养后的细胞接种于TSAS中，受损细胞又恢复到耐受7.0%NaCl的能力。

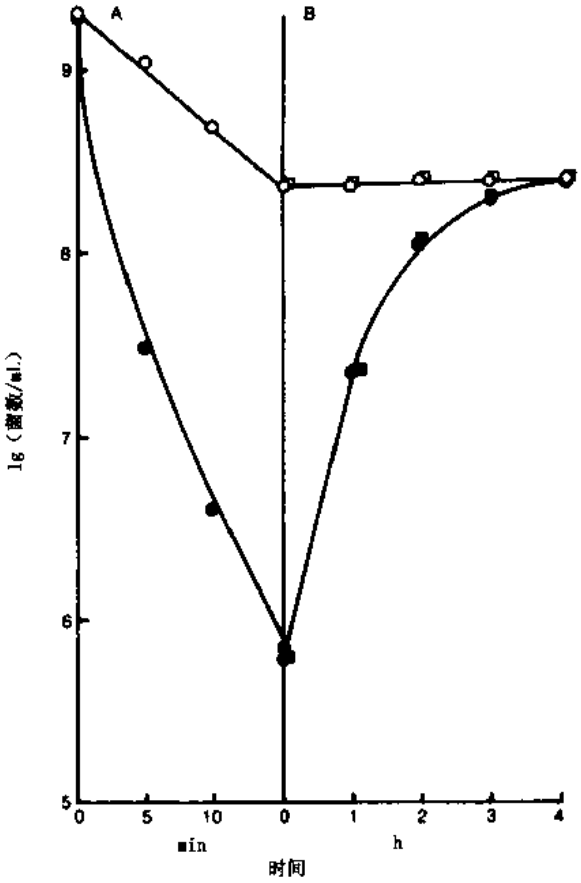


图10.2　*S. aureus* 的生长和恢复曲线 MF = 31[118]

A　在52℃下100mol/L K_3PO_4 缓冲液热损伤15min

B—在37℃下营养肉汤（NB）中进行热损伤后的再生过程

符号说明：○— TSAS平板培养基上活菌总数。

●　TSAS平板培养基上未受热损伤的细胞数，即包含有100μg/mL的NB中复活的细胞数。

■　TSAS单数培养样品。

不仅从病原体的角度，而且从腐败细菌的角度来看，食品中代谢受损的细胞的存在和受损细胞在培养过程中的恢复都有着重要的意义。实验证明：使用高盐培养基检测高温消毒过的食品中受损细胞金黄色葡萄球菌时，得到的活性细胞数要比实际值低。食品中微生物的受损不仅来自亚致死高温、冷冻，而且还来自于冷冻干燥、干燥、激光、杀虫剂、染料、固态叠氮化合物、盐、重金属、抗生素、油和一些化学物质如EDTA和清洁剂等。

在本世纪初，人们就对食品中的亚致死条件和其生长所受的影响进行了研究，但直

到 20 世纪 60 年代，对此才有了全面的认识。在 20 世纪 60 年代的早期，人们发现经过恢复处理“长生鸟现象”，受损细胞数大量减少。在 1943 年，Nelson[77]发现受热处理后的细菌所需的营养物质提高 Gunderson 和 Rose[40]记录了冷冻鸡肉中大肠杆菌在 VRBA 上生长数量的变化，当冷藏时间延长时，减少的数量增加。Hartsell[44]在食品中接种沙门氏菌，然后将食品冷冻，研究食品中菌体的情况。在高营养非选择性培养基中微生物的生长数量多于在选择性培养基中的生长数，选择性培养基有 MacCondiy，脱氧胆酸盐，VRBA 等。Postgate 和 Hunter[93]以及 Harris[42]研究记载了用于发现受损细胞的分离培养基。受到环境影响的微生物除了需要更多的营养物质，还会出现延迟期增长，对选择性培养试剂的敏感性提高，细胞膜受损，三羧酸循环中的酶受损，核糖体解体和 DNA 被破坏。亚致死高温会引起核糖体解体和 DNA 破坏，但并不是所有破坏因素都有特定的受损现象。

10.12.1 恢复与修复

细胞代谢受损后可以修复，至少金黄色葡萄球菌是如此。在非生长培养基中培养[53]，温度控制为 15 C 而不是 10℃[46]。在一些实例中，修复并不是瞬间完成的，所有受损的大肠杆菌的修复程度并不相同，修复过程也是逐步进行的[68]。并非所有的细胞受损程度都相同。Hurst 等人[50]发现因干燥受损的金黄色葡萄球菌细胞在非选择性培养基 TSA 中不能生长，但当加入丙酮酸后就可生长。这些细胞被认为严重受损。人们发现经亚致死高温处理的金黄色葡萄球菌细胞在某些膜功能恢复之前能恢复其耐盐的能力[52]。研究发现受损修复通常是发生在细胞壁和蛋白质合成的修复。从图 10.2 中可以看到，修复培养基中氯霉素的存在并没有对亚致死高温受损的金黄色葡萄球菌造成影响。细胞染色体和膜的修复对受到亚致死高温、冷冻、干燥和激光损害的细胞十分重要。

受热和冷冻伤害的细胞需要复杂的培养基和特殊化合物的保护。牛乳比生理盐水和氨基酸混合物更能提供好的保护，牛乳中含有大量的磷酸盐、酪蛋白和半乳糖。蔗糖对热损伤细胞有保护作用[2,63]，而葡萄糖会降低对金黄色葡萄球菌的热保护作用[73]。非代谢性糖和多元醇，如阿拉伯糖、木糖和山梨醇，可保护金黄色葡萄球菌免受亚致死高温的伤害，但人们对其作用原理仍不清楚[1,3]。

Busta 总结了不经过修复步骤的结果[18]。使用 TSB 进行接种培养 1～24h，温度控制为 20～37 C，此方法广泛适用于各种微生物。人们对受亚致死高温损伤的金黄色葡萄球菌在各种培养基上生长情况进行了研究[14,31,50]。在其中的一项研究中，比较了 7 种葡萄球菌培养基对 19 株受热损伤的金黄色葡萄球菌的修复情况发现：Bairs-Parker 培养基是最好的培养基。在 AOAC 对含金黄色葡萄球菌细胞数≥10 个/g 的食品检测中也发现 Bairs-Parker 培养基比较好。此培养基的高效性主要在于它含有丙酮酸。在含抗生素的非选择性培养基中恢复的细胞可转入此培养基中[50]。尽管这一方法适用于金黄色葡萄球菌，但由于培养基中抗生素的使用会抑制细胞的生长。一些研究表明产气夹膜梭菌对多黏菌素和新霉素敏感[10]，抗生素会影响许多微生物细胞壁的合成而导致变异。

丙酮酸是一种很好的恢复试剂，不仅对金黄色葡萄球菌，对其它微生物如大肠杆菌也是如此。受冷冻和热损伤的大肠杆菌经丙酮酸处理后，恢复量显著增加。当在含有 10%

NaCl 胰酶解酪蛋白黄豆肉汤中接种金黄色葡萄球菌时，受损和非受损菌体生长量都有提高[14]。

过氧化氢酶是另一种用于损伤的好氧微生物恢复的有效试剂。Martin 等人[66]首先对此进行了报道。它对于受到亚致死高温影响的金黄色葡萄球菌、荧光假单胞菌、鼠伤寒沙门氏菌、大肠杆菌[66]有良好的恢复作用。它对于存在于 10%NaCl 溶液中的金黄色葡萄球菌[14]和受到水压损伤的金黄色葡萄球菌[31]也有良好的恢复作用。另一种化合物，3,3′-噻吩丙酸，对热损伤大肠杆菌有与丙酮酸相同的疗效[64]。

在多黏菌素和新霉素存在时，受 4kGy 辐射损伤的肉毒梭菌在 10℃条件下不能生长[101]。受损细胞快速萌芽系统被破坏，在生长中形成无隔菌丝体，但细胞的溶菌酶系统没有被破坏。在不含抗生素的亚硫酸盐多黏菌素蛋黄琼脂培养基（TPEY）中，30℃下，培养 15h，可使辐射损伤恢复。当肉毒梭菌芽孢受到次氯酸盐伤害时，L 丙氨酸的生成系统被破坏，恢复时需要添加高浓度的丙氨酸[34]。乳酸盐可以激活 L-丙氨酸的生成，经次氯酸盐处理的芽孢可在溶解酵素的作用下萌芽，这表明氯化物除去了芽孢的蛋白质外衣[34]。Foegeding 和 Busta[32]对芽孢损伤有更详细的阐述[32]。

受亚致死高温处理的酵母菌受到一些精油（稍加入 25μL/L）的抑制[21]，这些油影响菌落的大小和产物的生产。

Speck 等人[14]和 Hartman 等人[15]发现了使受损细胞恢复的特殊培养基和计数方法。方法中使用琼脂覆盖培养技术，其中含有 TSA 层，其上接种受损菌种。经过 1～2h 25℃恒温培养恢复，TSA 层被 VRBA 覆盖于 35℃下恒温培养 24h。Hartman 等人的覆盖方法中使用了改进的 VRBA。当然，覆盖技术也可使用其它选择性培养基。覆盖技术被用于大肠菌群的检测。在此方法中，大肠菌在 TSA 上 35℃恒温培养 2h，然后覆盖 VRBA 培养。

在 Beuchat[13]的 18 个培养基和营养肉汤对副溶血弧菌的恢复培养的比较中，他发现两个最有效的培养基为水蓝-茜素黄培养基和阿拉伯糖-胺 硫酸盐-胆酸盐培养基；最有效的肉汤为阿拉伯糖-乙基紫色肉汤。

10.12.2 机理

丙酮酸和过氧化氢酶可降解过氧化氢，而受损细胞缺少这种能力。受到热处理的大肠杆菌不能在倾注培养基中生长而可以在涂布培养基中生长，可能是因为缺少过氧化氢。

许多研究者发现细胞代谢的破坏总是与细胞膜、核糖体、DNA 或酶的破坏相伴的。细胞膜是最常见的损伤[49]。细胞膜中的脂含量是受损细胞的标志物，特别是对亚致死高温损伤。核糖体的破坏是因为缺少 Mg^{2+} 而不是受热引起的[51]。另一方面，在金黄色葡萄球菌受热细胞中可通过电子显微镜观察到染色质区域[57]。细胞在 50℃加热，观察不到核糖体，细胞表面出现水疱，内膜扩张[57]。当金黄色葡萄球菌在 37℃暴露于乙酸、盐酸和乳酸中受到酸损伤，细胞中凝固酶和热稳定性核酸酶的活性降低[128]。酸损伤不影响细胞膜，但对 RNA 合成有影响。

关于细胞受伤和恢复方法，在文献 4 中有详细介绍。

10.13 不可生长的活性微生物

在一些环境和条件下，平板菌落计数的结果可能明显低于实际的活性菌体数量。这除了因为受损细胞的存在以外，还因为有一些不可生长的活性细胞（VBNC）的存在。例如，当在不含抑制物的非选择性培养基上培养时，代谢受损的细胞可以生长，但 VBNC 细胞却不能生长。

VBNC 首先在弧菌中发现，此生物在冬季的盐水中很难培养。当温度降低到 5℃时，就会出现这种状态。在 Campylobacter jejuni 的早期研究中，处于延迟期的细胞为螺旋形，而处于恒定期的细胞为球形[190]。在 4℃下 VBNC 状态可保持 4 个月以上。处于 VBNC 状态的细胞通过标准平板计数数量很少，而通过直接活细胞计数和吖啶橙直接计数，可得到很高的数量，图 10.3 阐述了此现象。

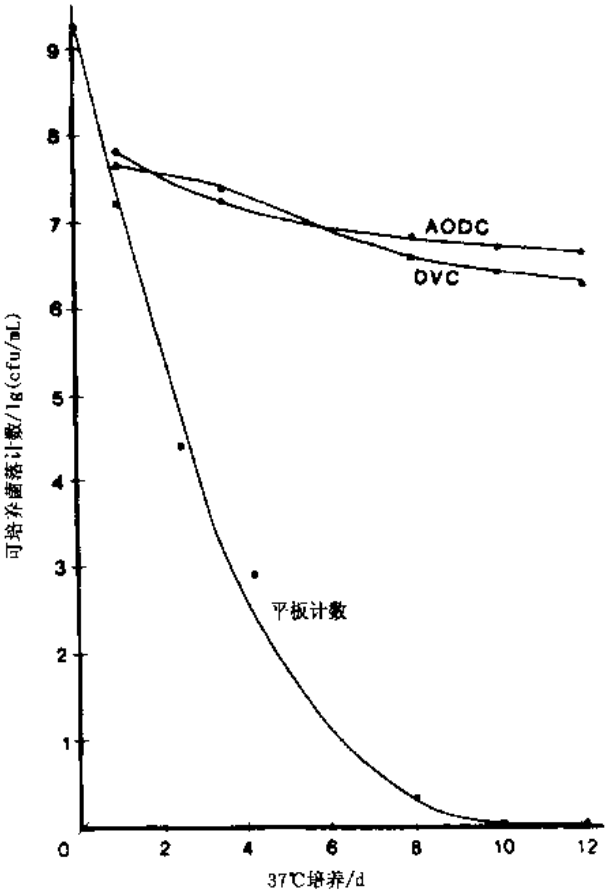


图 10.3 Campylobaoter 活性细胞记数与平板记数（5%羊血琼脂平板）比较（■）；DVC 分析未经 DNA 复制的蛋白质合成（▲）；AODC（●）经蒸气水处理后的活性细胞[190]

在 VBNC 状态的细胞呈球形，在创伤弧菌研究中，细胞在 5℃营养缺陷的海水中培养 27d 后，进入 VBNC 状态[178]。在另一研究中，温度降低到 5℃培养 7d，创伤弧菌就进入 VBNC 状态[183]。当温度到达 21℃时，24h 内细胞可恢复原状态[184]。在微生物进入VBNC状态时，细胞内脂肪和蛋白质的合成发生变化。当温度从 23℃降到 13℃时，时间由 3h 变为 13.1h，创伤弧菌中则有 40 种新的蛋白质合成[170]。处于 VBNC 状态的创伤弧菌具有毒性，尽管毒性处于降低的水平[183]。肠炎沙门氏菌，志贺氏菌，霍乱弧菌，和大肠杆菌均有 VBNC 状态。

参 考 文 献

[1] Alcock, S. J., L. P. Hall, and J. H. Blanchard. 1987. Methylene blue test to assess the microbial contamination of frozen peas. *Food Microbiol.* 4: 3～10.

[2] Allwood, M. C., and A. D. Russell. 1967. Mechanism of thermal injury in *Staphylococcus aureus*. I. Relationship between viability and leakage. *Appl. Microbiol.* 15: 1266～1269.

[3] Anderson, K. L., and D. Y. C. Fung. 1983. Anaerobic methods, techniques and principles for food bacteriology: A review. *J. Food Protect.* 46: 811～822.

[4] Andrew, M. H. E., and A. D. Russell. 1984. *The Revival of Injured Microbes*. London: Academic Press.

[5] Andrews. W. H., C. R. Wilson, P. L. Poelma, A. Romero, R. A. Rude, A. P. Duran, F. D. McClure, and D. E. Gentile. 1978. Usefulness of the Stomacher in a microbiological regulatory laboratory. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 89～93.

[6] Angelotti, R., and M. J. Foter. 1958. A direct surface agar plate laboratory method for quantitatively detecting bacterial contamination on nonporous surfaces. *Food Res.* 23: 170～174.

[7] Angelotti, R., J. L. Wilson, W. Litsky, and W. G. Walter. 1964. Comparative evaluation of the cotton swab and rodac methods for the recovery of *Bacillus subtilis* spore contamination from stainless steel surfaces. *Hlth. Lab. Sci.* 1: 289～296.

[8] Association of Official Analytical Chemists. 1983. Enumeration of coliforms in selected foods. Hydrophobic grid membrane filter method, official first action. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66: 547～518.

[9] Austin, B. L., and B. Thomas. 1972. Dye reduction tests on meat products. *J. Sci. Food Agric.* 23: 542.

[10] Barach, J. T., R. S. Flowers, and D. M. Adams. 1975. Repair of heat-injured *Clostridium perfringens* spores during outgrowth. *Appl. Microbiol.* 30: 873～875.

[11] Betts, R. P., P. Bankes, and J. G. Board. 1989. Rapid enumeration of viable micro-organisms by staining and direct microscopy. *Lett. Appl. Microbiol.* 9: 199～202.

[12] Beuchat, L. R., ed. 1987. *Food and Beverage Mycology*, 2d ed. New York: Van Nostrand Reinhold.

[13] Beuchat, L. R., and R. V. Lechowich. 1968. Effect of salt concentration in the recovery medium on heat-injured *Streptococcus faecalis*. *Appl. Microbiol.* 16: 772～776.

[14] Brewer, D. G., S. E. Martin, and Z. J. Ordal. 1977. Beneficial effects of catalase or pyruvate in a most-probable-number technique for the detection of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 797～800.

[15] Brodsky, M. H., P. Entis, A. N. Sharpe, and G. A. Jarvis. 1982. Enumeration of indicator organisms in foods using the automated hydrophobic grid membrane filter technique. *J. Food Protect.* 45: 292～296.

[16] Brodsky, M. H., P. Entis, M. P. Entis, A. N. Sharpe, and G. A. Jarvis. 1982. Determination of aerobic plate and yeast and mold counts in foods using an automated hydrophobic grid membrane filter technique. *J. Food Protect.* 45: 301～304.

[17] Brodsky, M. H., P. Boleszczuk, and P. Entis. 1982. Effect of stress and resuscitation on recovery of indicator bacteria from foods using hydrophobic grid-membrane filtration. *J. Food Protect.* 45: 1326～1331.

[18] Busta, F. F. 1976. Practical implications of injured microorganisms in food. *J. Milk Food Technol.* 39: 138～145.

[19] Clark, D. S. 1965. Method of estimating the bacterial population of surfaces. *Can J. Microbiol.* 11: 407～413.

[20] Clark, D. S. 1965. Improvement of spray gun method of estimating bacterial populations on surfaces. *Can. J. Microbiol.* 11: 1021～1022.

[21] Conner. D. E., and L. R. Beuchat. 1984. Sensitivity of heat-stressed yeasts to essential oils of plants. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 229～233.

[22] Cordray, J. C., and D. L. Huffman. 1985. Comparison of three methods for estimating surface bacteria on pork carcasses. *J. Food Protect.* 48: 582～584.

[23] Cousin. M. A. 1982. Evaluation of a test strip used to monitor food processing sanitation. *J. Food Protect.* 45: 615～619, 623.

[24] deFigueiredo, M. P., and J. M. Jay. 1976. Coliforms, enterococci, and other microbial indicators. In *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*, ed M. P. deFigueiredo and D. F. Splittstoesser, 271～297. Westport, CT: AVI.

[25] Dodsworth, P. J., and A. G. Kempton. 1977. Rapid measurement of meat quality by resazurin reduction. II. Industrial application. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 10: 158～160.

[26] Donnelly, C. B., J. E. Gilchrist, J. T. Peeler, and J. E. Campbell. 1976. Spiral plate count method for the examination of raw and pasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 21～27.

[27] Entis, P. 1985. Rapid hydrophobic grid membrane filter method for *Salmonella* detection in selected foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 68: 555～564.

[28] Entis, P. 1983. Enumeration of coliforms in non-fat dry milk and canned custard by hydrophobic grid membrane filter method: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66: 897～904.

[29] Favero, M. S., J. J. McDade, J. A. Robertsen, R. K. Hoffman, and R. W. Edwards. 1968. Microbiological sampling of surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 336～343.

[30] *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed. 1995. McLean, VA: Association of Official Analytical Chemists Int.

[31] Flowers, R. S., S. E. Martin, D. G. Brewer, and Z. J. Ordal. 1977. Catalase and enumeration of stressed *Staphylococcus aureus* cells. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1112～1117.

[32] Foegeding, P. M., and F. F. Busta. 1981. Bacterial spore injury—an update. *J. Food Protect.* 44: 776～786.

[33] Foegeding, P. M., and F. F. Busta. 1983. Proposed role of lactate in germination of hypochlorite treated *Clostridium botulinum* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1369～1373.

[34] Foegeding, P. M., and F. F. Busta. 1983. Proposed mechanism for sensitization by hypochlorite treatment of *Clostridium botulinum* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 15: 1374～1379.

[35] Fung, D. Y. C., C. -Y. Lee, and C. L. Kastner. 1980. Adhesive tape method for estimating microbial load on meat surfaces. *J. Food Protect.* 43: 295～297.

[36] Fung, D. Y., and L. L. VandenBosch. 1975. Repair, growth, and enterotoxigenesis of *Staphylococcus aureus* S-6 injured by freeze-drying. *J. Milk Food Technol.* 38: 212～218.

[37] Garvie, E. I., and A. Rowlands. 1952. The role of micro-organisms in dye reduction and keeping-quality tests. II. The effect of micro-organisms when added to milk in pure and mixed culture. *J. Dairy Res.* 19: 263～274.

[38] Gilchrist, J. E., J. E. Campbell, C. B. Donnelly, J. T. Peeler, and J. M. Delaney. 1973. Spiral plate method for bacterial determination. *Appl. Microbiol.* 25: 241～252.

[39] Ginn, R. E., V. S. Packard, and T. L. Fox. 1984. Evaluation of the 3M dry medium culture plate (Petrifilm™ SM) method for determining numbers of bacteria in raw milk. *J. Food Protect.*

47: 753～755.

[40] Gunderson, M. F., and K. D. Rose. 1948. Survival of bacteria in a precooked. fresh frozen food. *Food Res.* 13: 254～263.

[41] Harries, D., and A. D. Russell. 1966. Revival of heat-damaged *Escherichia coli*. *Experientia* 22: 803～804.

[42] Harris, N. D. 1963. The influence of the recovery medium and the incubation temperature on the survival of damaged bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 387～397.

[43] Hartman, P. A., P. S. Hartman, and W. W. Lanz. 1975. Violet red bile 2 agar for stressed coliforms. *Appl. Microbiol.* 29: 537～539.

[44] Hartsell, S. E. 1951. The longevity and behavior of pathogenic bacteria in frozen foods: The influence of plating media. *Amer. J. Pub. Hlth.* 41: 1072～1077.

[45] Hedges, A. J., R. Shannon, and R. P. Hobbs. 1978. Comparison of the precision obtained in counting viable bacteria by the spiral plate maker, the droplette and the Miles & Misra methods. *J. Appl. Bacteriol.* 45: 57～65.

[46] Hobbie, J. E., R. J. Daley, and S. Jasper. 1977. Use of nucleopore filters for counting bacteria by fluorescence microscopy. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1225～1228.

[47] Holah, J. T., R. P. Betts, and R. H. Thorpe. 1988. The use of direct epifluorescent microscopy (DEM) and the direct epifluorescent filter technique (DEFT) to assess microbial populations on food contact surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 215～221.

[48] Holley, R. A., S. M. Smith, and A. G. Kempton. 1977. Rapid measurement of meat quality by resazurin reduction. I. Factors affecting test validity. *Can Inst. Food Sci. Technol. J.* 10: 153～157.

[49] Hurst, A. 1977. Bacterial injury: A review. *Can. J. Microbiol.* 23: 935～944.

[50] Hurst, A., G. S. Hendry, A. Hughes, and B. Paley. 1976. Enumeration of sublethally heated staphylococci in some dried foods. *Can. J. Microbiol.* 22: 677～683.

[51] Hurst, A., and A. Hughes. 1978. Stability of ribosomes of *Staphylococcus aureus* S-6 sublethally heated in different buffers. *J. Bacteriol.* 133: 564～568.

[52] Hurst, A., A. Hughes, J. L. Beare-Rogers, and D. L. Collins-Thompson. 1973. Physiological studies on the recovery of salt tolerance by *Staphylococcus aureus* after sublethal heating. *J. Bacteriol.* 116: 901～907.

[53] Hurst, A., A. Hughes, D. L. Collins-Thompson, and B. G. Shah. 1974. Relationship between loss of magnesium and loss of salt tolerance after sublethal heating of *Staphylococcus aureus*. *Can. J. Microbiol.* 20: 1153～1158.

[54] Hutcheson, T. C., T. McKay, L. Farr, and B. Seddon. 1988. Evaluation of the stain Viablue for the rapid estimation of viable yeast cells. *Lett. Appl. Microbiol.* 6: 85～88.

[55] Jarvis, B., V. H. Lach, and J. M. Wood. 1977. Evaluation of the spiral plate maker for the enumeration of micro-organisms in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 149～157.

[56] Jay, J. M., and S. Margitic. 1979. Comparison of homogenizing, shaking, and blending of the recovery of microorganisms and endotoxins from fresh and frozen ground beef as assessed by plate counts and the *Limulus* amoebocyte lysate test. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 879～884.

[57] Jones, S. B., S. A. Palumbo, and J. L. Smith. 1983. Electron microscopy of heat-injured and repaired *Staphylococcus aureus*. *J. Food Safety* 5: 145～157.

[58] Juffs, H. S., and F. J. Babel. 1975. Rapid enumeration of psychrotrophic bacteria in raw milk by the microscopic colony count. *J. Milk Food Technol.* 38: 333～336.

[59] Knabel, S. J., H. W. Walker, and A. A. Kraft. 1987. Enumeration of fluoresscent pseudomonads on poultry by using the hydrophobic-grid membrane filter method. *J. Food Sci.* 52: 837～841, 845.

[60] Koch, H. A., R. Bandler, and R. R. Gibson. 1986. Fluorescence microscopy procedure for quantification of yeasts in beverages. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 599～601.

[61] Koller, W. 1984. Recovery of test bacteria from surfaces with a simple new swab-rinse technique: A contribution to methods for evaluation of surface disinfectants. *Zent. Bakteriol. Hyg. I. Orig. B* 179: 112～124.

[62] Konuma, H., A. Suzuki, and H. Kurata. 1982. Improved Stomacher 400 bag applicable to the spiral plate system for counting bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 765～769.

[63] Lee, A. C., and J. M. Goepfert. 1975. Influence of selected solutes on thermally induced death and injury of *Salmonella typhimurium*. *J. Milk Food Technol.* 38: 195～200.

[64] *Manual of Clinical Microbiology*, 6th ed. 1995. Washington, DC: American Society of Microbiology Press.

[65] Marshall, R. T., ed 1993. *Standard Methods for the Examination of Dairy Products*. 16th ed. Washington, DC: American Public Health Association.

[66] Martin, S. E., R. S. Flowers, and Z. J. Ordal. 1976. Catalase: Its effect on microbial enumeration. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 731～734.

[67] Matner, R. R., T. L. Fox, D. E. Melver, and M. S. Curiale. 1990. Efficacy of Petrifilm™ count plates for *E. coli* and coliform enumeration. *J. Food Protect.* 53: 145～150.

[68] Maxcy, R. B. 1973. Condition of coliform organisms influencing recovery of subcultures on selective media. *J. Milk Food Technol.* 36: 414～416.

[69] McDonald, L. C., C. R. Hackney, and B. Ray. 1983. Enhanced recovery of injured *Escherichia coli* by compounds that degrade hydrogen peroxide or block its formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 360～365.

[70] McGovern, V. P., and J. D. Oliver. 1995. Induction of cold-responsive proteins in *Vibriovulnificus*. *J. Bacteriol.* 177: 4131～4133.

[71] *Microorganisms in Foods*. 1982. Vol. 1. *Their Significance and Methods of Enumeration*, 2d ed. ICMSF. Toronto: University of Toronto Press.

[72] *Microorganisms in Foods*. 1986. Vol. 2. *Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications*, 2d. ICMSF. Toronto: University of Toronto Press.

[73] Moats, W. A., R. Dabbah, and V. M. Edwards. 1971. Survival of *Salmonella anatum* heated in various media. *Appl. Microbiol.* 21: 476～481.

[74] Mossel, D. A. A., E. H. Kampelmacher, and L. M. Van Noorle Jansen. 1966. Verification of adequate sanitation of wooden surfaces used in meat and poultry processing. *Zent. Bakteriol. Parasiten., Infek. Hyg. Abt. I.* 201: 91～104.

[75] Neal, N. D., and H. W. Walker. 1977. Recovery of bacterial endospores from a metal surface after treatment with hydrogen peroxide. *J. Food Sci.* 42: 1600～1602.

[76] Nelson, C. L., T. L. Fox, and F. F. Busta. 1984. Evaluation of dry medium film (Petrifilm VRB) for coliform enumeration. *J. Food Protec.* 47: 520～525.

[77] Nelson, F. E. 1943. Factors which influence the growth of heat-treated bacteria. I. A comparison of four agar media. *J. Bacteriol.* 45: 395～403.

[78] Nilsson, L., J. D. Oliver, and S. Kjelleberg. 1991. Resuscitation of *Vibrio vulnificus* from the viable but nonculturable state. *J. Bacteriol.* 173: 5054～5059.

[79] Niskanen, A., and M. S. Pohja. 1977. Comparative studies on the sampling and investigation of microbial contamination of surfaces by the contact plate and swab methods. *J. Appl. Bacteriol.* 42: 53～63.

[80] Nortje, G. L., E. Swanepoel, R. T. Naude, W. H. Holzapfel, and P. L. Steyn. 1982. Evaluation of three carcass surface microbial sampling techniques. *J. Food Protect.* 45: 1016～1017, 1021.

[81] *Official Methods of Analysis*, 16th ed., vol. I. 1995. McLean, VA: Association of Official Analytical Chemists Int.

[82] Olgaard, K. 1977. Determination of relative bacterial levels on carcasses and meats—A new quick method. *J. Appl. Bacteriol.* 42: 321～329.

[83] Oliver, J. D., and R. Bockian. 1995. In vivo resuscitation, and virulence towards mice, of viable but nonculturable cells of *Vibrio vulnificus*. *Appl. Envrion. Microbiol.* 61: 2620～2623.

[84] Oliver, J. D., F. Hite, D. McDougald, N. L. Andon, and L. M. Simpson. 1995. Entry into, and resuscitation from, the viable but nonculturable state by *Vibrio vulnificus* in an estaurine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2624～2630.

[85] Patterson, J. T. 1971. Microbiological assessment of surfaces. *J. Food Technol.* 6: 63～72.

[86] Peeler, J. T., J. E. Gilchrist, C. B. Donnelly, and J. E. Campbell. 1977. A collaborative study of the spiral plate method for examining milk samples. *J. Food Protect.* 40: 462～464.

[87] Pettipher, G. L. 1983. *The Direct Epifluorescent Filter Technique for the Rapid Enumeration of Microorganisms*. New York: Wiley.

[88] Pettipher, G. L., R. J. Fulford, and L. A. Mabbitt. 1983. Collaborative trial of the direct epifluorescent filter technique (DEFT), a rapid method for counting bacteria in milk. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 177～182.

[89] Pettipher, G. L., R. Mansell, C. H. McKinnon, and C. M. Cousins. 1980. Rapid membrane filtration-epifluorescent microscopy technique for direct enumeration of bacteria in raw milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 423～429.

[90] Pettipher, G. L., and U. M. Rodrigues. 1981. Rapid enumeration of bacteria in heat-treated milk and milk products using a membrane filtration-epifluorescent microscopy technique. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 157～166.

[91] Pettipher, G. L., and U. M. Rodrigues. 1982. Rapid enumeration of microorganisms in foods by the direct epifluorescent filter technique. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 809～813.

[92] Pettipher, G. L., R. A. Williams, and C. S. Gutteridge. 1985. An evaluation of possible alternative methods to the Howard mould count. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 49～51.

[93] Postgate, J. R., and J. R. Hunter. 1963. Metabolic injury in frozen bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 405～414.

[94] Puleo, J. R., M. S. Favero, and N. J. Petersen. 1967. Use of ultrasonic energy in assessing microbial contamination on surfaces. *Appl. Microbiol.* 15: 1345～1351.

[95] Rao, D. N., and V. S. Murthy. 1986. Rapid dye reduction tests for the determination of microbiological quality of meat. *J. Food Technol.* 21: 151～157.

[96] Reyniers, J. A. 1935. Mechanising the viable count. *J. Pathol. Bacteriol.* 40: 437～454.

[97] Rodrigues, U. M., and R. G. Kroll. 1989. Microcolony epifluorescence microscopy for selective enumeration of injured bacteria in frozen and heat-treated foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 778～787.

[98] Rodrigues, U. M., and R. G. Kroll. 1988. Rapid selective enumeration of bacteria in foods using a micro-colony epifluorescence microscopy technique. *J. Appl. Bacteriol.* 64: 65～78.

[99] Rodrigues, U. M., and R. G. Kroll. 1985. The direct epifluorescent filter technique (DEFT): Increased selectivity, sensitivity and rapidity. *J. Appl. Bacteriol.* 59: 493～499.

[100] Rollins, D. M., and R. R. Colwell. 1986. Viable but nonculturable stage of *Campylobacter jejuni* and its role in survival in the natural aquatic environment *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 531～538.

[101] Rowley, D. B., R. Firstenberg-Eden, and G. E. Shattuck. 1983. Radiation-injured *Clostridium botulinum* type E spores: Outgrowth and repair. *J. Food Sci.* 48: 1829～1831, 1848.

[102] Saffle, R. L., K. N. May, H. A. Hamid, and J. D. Irby. 1961. Comparing three rapid methods of detecting spoilage in meat. *Food Technol.* 15: 465～467.

[103] Scott, E., S. F. Bloomfield, and C. G. Barlow. 1984. A comparison of contact plate and calcium alginate swab techniques of environmental surfaces. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 317～320.

[104] Sharpe, A. N., and G. C. Harshman. 1976. Recovery of *Clostridium perfringens*, *Staphylococcus aureus*, and molds from foods by the Stomacher: Effect of fat content, surfactant concentration, and blending time. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 9: 30～34.

[105] Sharpe, A. N., and A. K. Jackson. 1972. Stomaching: A new concept in bacteriological sample preparation. *Appl. Microbiol.* 24: 175～178.

[106] Sharpe, A. N., and D. C. Kilsby. 1971. A rapid, inexpensive bacterial count technique using agar droplets. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 435～440.

[107] Sharpe, A. N., M. P. Diotte, I. Dudas, S. Malcolm, and P. I. Peterkin. 1983. Colony counting on hydrophobic grid-membrane filters. *Can. J. Microbiol.* 29: 797～802.

[108] Sharpe, A. N., P. I. Peterkin, and N. Malik. 1979. Improved detection of coliforms and *Escherichia coli* in foods by a membrane filter method. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 431～435.

[109] Sharpe, A. N., and G. L. Michaud. 1974. Hydrophobic grid-membrane filters: New approach to microbiological enumeration. *Appl. Microbiol.* 28: 223～225.

[110] Sharpe, A. N., and G. L. Michaud. 1975. Enumeration of high numbers of bacteria using hydrophobic grid-membrane filters. *Appl. Microbiol.* 30: 519～524.

[111] Shaw, B. G., C. D. Harding, W. H. Hudson, and L. Farr. 1987. Rapid estimation of microbial numbers on meat and poultry by direct epifluorescent filter technique. *J. Food Protect.* 50: 652～657.

[112] Silliker, J. H., D. A. Gabis, and A. May. 1979. ICMSF methods studies. XI. Collaborative/comparative studies on determination of coliforms using the most probable number procedure. *J. Food Protect.* 42: 638～644.

[113] Smith, J. L., R. C. Benedict, M. Haas, and S. A. Palumbo. 1983. Heat injury in *Staphylococcus aureus* 196E: Protection by metabolizable and non-metabolizable sugars and polyols. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1417～1419.

[114] Speck, M. L., B. Ray, and R. B. Read, Jr. 1975. Repair and enumeration of injured coliforms

by a plating procedure. *Appl. Microbiol.* 29: 549～550.

[115] Szabo, R. A., E. C. D. Todd, and A. Jean. 1986. Method to isolate *Escherichia coli* 0157: H7 from food *J. Food Protect.* 49: 768～772.

[116] ten Cate, L. 1963. An easy and rapid bacteriological control method in meat processing industries using agar sausage techniques in Rilsan artificial casing. *Fleischwarts.* 15: 483～486.

[117] Todd, E. C. D., R. A. Szabo, P. Peterkin, A. N. Sharpe, L. Parrington, D. Bundle, M. A. J. Gidney, and M. B. Perry. 1988. Rapid hydrophobic grid membrane filter-enzyme-labeled antibody procedure for identification and enumeration of *Escherichia coli* 0157 in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2526～2510.

[118] Tomlins, R. I., M. D. Pierson, and Z. J. Ordal. 1971. Effect of thermal injury on the TCA cycle enzymes of *Staphylococcus aureus* MF 31 and *Salmonella typhimurium* 7136. *Can. J. Microbiol.* 17: 759～765.

[119] Trotman, R. E. 1971. The automatic spreading of bacterial culture over a solid agar plate. *J. Appl. Bacteriol.* 34: 615～616.

[120] Tuttlebee, J. W. 1975. The Stomacher Its use for homogenization in food microbiology. *J. Food Technol.* 10: 113～122.

[121] Vanderzant, C., and D. F. Splittstoesser, eds. 1992. *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods.* Washington, DC: American Public Health Association.

[122] Woodward, R. L. 1957. How probable is the most probable number? *J. Amer. Water Works Assoc.* 49: 1060～1068.

[123] Zayaitz, A. E. K., and R. A. Ledford. 1985. Characteristics of acid-injury and recovery of *Staphylococcus aureus* in a model system. *J. Food Protect.* 48: 616～620.

11. 物理、化学、分子和免疫方法

本部分概括了自1960年以来用在微生物检测和鉴定方面的大多数方法。许多方法用于估算微生物细胞数量或细胞副产品的产量。与直接显微计数不同，许多方法是建立在以微生物的新陈代谢活性、对应生长情况的测量、细胞某些组分的测量（如核酸）或几者相结合为基础上。

11.1 物理方法

11.1.1 阻抗及相关方法

尽管早在1899年G. N. Stewart就提出了微生物的电阻抗的测量方法，但到20世纪70年代此方法才得到应用。

阻抗是电路中对交流电流的一种阻碍作用。当微生物在培养基上生长时，它们代谢导电率低的物质产生导电率高的产物，因而使培养基的阻抗降低。当测量肉汤培养基的阻抗时，阻抗曲线与菌种和菌株有关，可以通过添加特殊生长抑制因子鉴定微生物。在表11.1中列出了此技术可检测的最少细胞数10～100个。在3～5h内可检测细胞数10^5～10^6/mL，在5～7h内可检测细胞数10^4～10^5/mL[194]。检测的界限为10^6～10^7/mL。下面总结了一些应用于食品中的阻抗技术：

表11.1 物理、化学、免疫学分析方法可检测的毒素或微生物的最小量（摘自文献）

方 法	毒素或微生物	灵敏度
流体血球计数法	牛乳中的鼠伤寒沙门氏菌	40min内检测量10^3/mL，10/mL样品经6h非选择性富集后再检测
阻抗法	肉中的大肠菌	6.5h检测10^3/g
	培养基中的大肠菌	3.8h检测10个
微量热法	金黄色葡萄球菌细胞	12～13h检测2个
	金黄色葡萄球菌	HPR[a]～10^4个/mL
ATP测量法	牛肉	5min检测10^2/cm^2
辐射线测定法	冷冻橘汁中的微生物	6～10h检测10^4个·g
	水中的大肠菌	6h检测1～10个
荧光抗体法	沙门氏菌	10^6个/mL
	葡萄球菌内毒素B	～50ng/mL
	金黄色葡萄球菌毒素	10ng/g
热稳定性核酸酶法	金黄色葡萄球菌毒素	2.5～5ng
当溶菌产物试验	革兰氏阴性菌内毒素	大肠杆菌LPS 2～6pg

续表

方　法	毒素或微生物	灵敏度
放射性免疫测定	食品中的葡萄球菌内毒素 A、B、C、D、E	0.5～1.0ng/g
	脱脂牛乳中的葡萄球菌内毒素 B	2.2ng/mL
	葡萄球菌内素素 A、B	A 0.1ng/mL，B 0.5ng/mL
	葡萄球菌内素素 C_2	100pg
	大肠杆菌 STa 内毒素	50～500pg/试管
	牛乳中黄曲霉毒素 M_1	0.5ng/mL
	棕曲霉毒素 A	0.02mg/kg
	细菌细胞	8～10min 检测 500～1000 个
	花生油、玉米、小麦中的黄曲霉毒素 B_1	6ng/g
	玉米、小麦中的 Deoxynivalenol	20ng/g
电冰免疫扩散法	产气荚膜梭菌内毒素	10ng
	波特林毒素	3.7～5.6 老鼠角膜细胞 LD_{50}/0.1mL
Micro-ouchterlony	金黄色葡萄球菌内毒素 A，B	10～100ng/mL
	产气荚膜梭菌毒素 A	500ng/mL
勒克司发光法	各种细菌	～10cfu/mL
钝化免疫溶血法	大肠杆菌 LT 内毒素	＜100ng
红血球凝聚记数	金黄色芽孢杆菌内毒素	4ng/mL
乳胶凝集法	大肠杆菌 LT 内毒素	32ng/mL
单辐射免疫测定法	金黄色葡萄球菌内毒素	0.3μg/mL
红血球凝聚抑制法	葡萄球菌内毒素 B	1.3ng/mL
反钝化红血球凝聚法	葡萄球菌内毒素 B	1.5ng/mL
	产气荚膜梭菌毒素 A	1ng/mL
ELISA 法	wieners 中的葡萄球菌内毒素 A	0.4ng
	食品中的葡萄球菌内毒素 A、B、C	0.1ng/mL
	食品中的葡萄球菌内毒素 A、B、C、D、E	≥1ng/g
ELISA Cont'd	Botulinal 毒素 A	9 只老鼠 LD_{50}/mL 单克隆抗体
	Botulinal 毒素 A	50～100 只老鼠 i.p. LD_{50}
	Botulinal 毒素 E	100 只老鼠 LD_5
	黄曲霉毒素 B_1	25pg/分析
	牛奶中的黄曲霉毒素 M	0.25ng/mL
	黄曲霉毒素 B_1	＜1pg/分析
	沙门氏菌	10^4～10^5 个/mL
	AFB_1	0.2ng/mL（单克隆体）
	AFB_1	0.4ng/mL（多克隆体）
	AFM_1	1.0ng/mL（单克隆体）
	饲料中的 Fumonisins	250ng/g
	玉米中的玉米赤霉烯酮	1ng/g
	牛肉中的大肠杆菌 O157：H7	＜1 个/g
	产气荚膜梭菌内毒素	1pg/mL
	花生油中的 AFB_1	2.5ng/g

续表

方　法	毒素或微生物	灵敏度
多聚酶链反应	大豆中的棕曲霉毒素	1ng/mL
	大肠杆菌	1～5 个/100mL 水
	大肠杆菌	1 个
	单核细胞增生李斯特氏菌	1～10 个
	创伤弧菌	10^2cfu/g 牡蛎
	大肠杆菌 Stx1 和 Stx2	12h 检测 1 个/g
	肉毒梭菌毒素 A-- E	10fg（大约 3 个细胞）
	小肠结肠炎耶尔森氏菌	10～30cfu/g 肉

①在 200 种蔬菜样品的检测中，有 90%～95%的样品的阻抗测量与平板培养技术的计数结果相一致[64]。阻抗的测量需要 5h，此方法适用于奶油糕点、肉食和其它食品；

②需要用 7h 阻抗检测时间（IDT）或更少，可以分析得到巴氏消毒的牛乳中的微生物数量，其结果与好氧平板计数（APC）相同[25]。在 380 个样品分析中，有 323 个（85%）样品的阻抗分析是正确的。对 27 种牛乳样品使用同一标准分析在 10h 内就可完成。在 6 个实验中对牛乳进行了仔细分析研究，阻抗结果与标准平板计数结果相比变化较小[55]。在另一对牛乳的研究实验中，当使用 7h 筛滤样品（10^5cfu/mL）时，阻抗结果是有效的[63]。在图 11.1 中绘出了 132 种牛乳样品的 APC 和相关的 IDT 散点图；

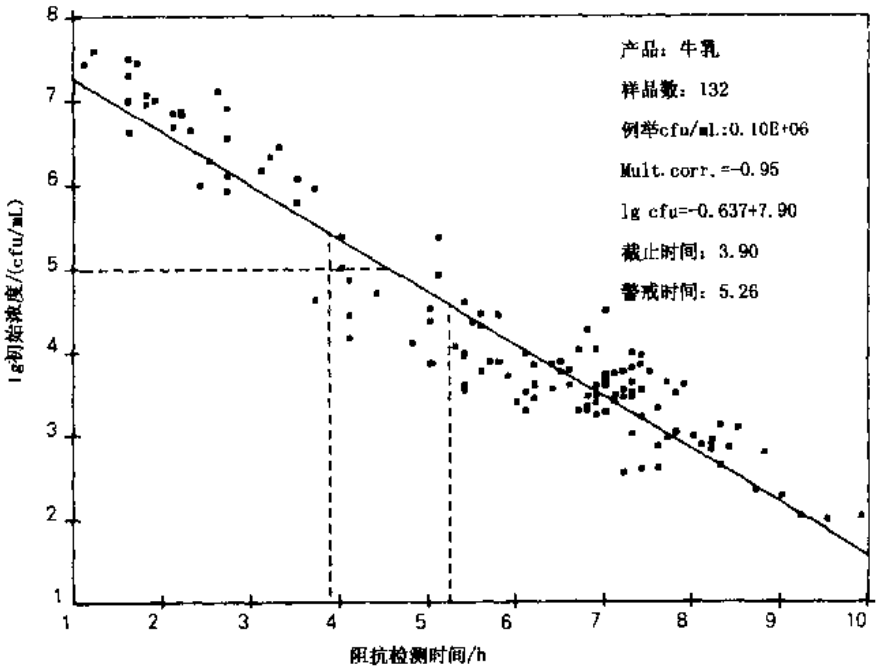


图 11.1　132 种未加工牛奶样品 APC 的 IDT 散点图

注：$>10^5$ 嗜温微生物/mL 的样品可在 4h 内检测完成。

③使用阻抗技术，酿造业中检测啤酒中腐败微生物的时间能够从3周或更长时间缩短到2～3d[49]。麦汁中酵母的生长使阻抗不断升高，而细菌生长过程使阻抗逐渐降低；

④在生牛肉的检测中，48个样品的IDT与lg细菌数量相反，回归率为0.97[54]。肉食品的IDT为9h。在另一研究中，通过阻抗技术检测鲜肉表面的微生物数量[22]，当细胞浓度为10^7个/mL或更高时，检测可在2h内准确地完成[22]；

⑤在检测冷冻浓缩橘子汁时，阻抗技术被用来区分微生物质量合格的产品（$<10^4$ cfu/mL）和不合格的产品（$>10^4$cfu/mL）。依据细菌的断流时间为10.2h，酵母的断流时间为15.8h，468个样品中有96%被正确划分；

⑥在牛肉中的大肠菌的检测中，使用了特殊的培养基，用阻抗技术分析了70个样品[113]。在此研究中，79%的阻抗结果与最近似数技术（MPN）三试管实验的95%的结果相同，并且在24h内可检测到少于100～21 000个/g的细胞数。在另一研究中，一种新的选择性培养基得到应用，它可以产生阻抗信号，与cfu结果相一致[56]。将10个大肠菌接种于新的培养基中，平均IDT为3.8h，在对96个鲜肉样品的分析实验中，阻抗和紫红胆汁琼脂培养基（VRBA）大肠杆菌校正计数之间的关系系数为0.90。含有菌体数为10^3/g的肉食检测时需要IDT 6.5h。当菌体数$>10^3$/g时，IDT为5.5h，当菌体数$<10^3$/g时，IDT为7.6h以上[56]。在鲜牛乳和消毒牛乳中的大肠菌的研究中，菌体数>10/mL时，IDT<9h，菌体数<10/mL时，IDT>12h[57]。

目前又出现一种新的设备，它不是运用阻抗技术，但其结果表示与阻抗技术相似。设备检测微生物产生的光谱变化，并将其记录下来作为光学单位与时间相对起来。与阻抗技术相似，此方法中将检测时间作为衡量活性细胞的参考值。检测肉汤培养基中的酿酒酵母，细胞浓度为1.1×10^6个/mL需要2.4h，而浓度为1.1×10^2个/mL时需要14.5h[64]。在对牛肉的检测中，通过此光学方法，10^5cfu/g需要的检测时间为6h，而10个细胞/g需要的检测时间为14h。

11.1.2 微量热法

此方法是通过对微量量热变化的研究来测量生长物质降解焓变，所测量的产热量与细胞的代谢密切相关[158]。

有两种类型的量热计：批次型和流动型。早期的研究者多使用批次型设备。微量量热计测量的变化热量来自分解代谢。微生物研究中广泛应用的微量量热计是Calvet设备。在10mL样品检测中，它的灵敏性为0.042J/h热流[58]。由于此方法检测快速，因此被应用于食品微生物的检测和鉴定。微量热量检测结果根据微生物的代谢，接种量和发酵基质的不同而变化。一些研究者发现[137]由于结果变化多种多样致使此方法应用于微生物鉴定还有问题，但在后来的研究中使用了一种合成培养基，Petty等人[158]成功鉴定了工业用酵母菌株。鉴定酵母中所使用的设备很重要，使用流动型微量量热计效果较好[112]。此设备在微量量热计上安装有流动量热容器。使用含有七种糖的化学培养基，利用9种乳酸菌（肠球菌，肠膜明串珠菌，乳杆菌属）的热解曲线可以对菌种进行鉴定[61]。在30℃条件下培养酪链球菌，其它菌种均在37℃条件下培养，24h就可得到检测结果。

此方法用于研究罐装食品中的腐败微生物、区别杆菌科、检测金黄色葡萄球菌的存

在以及估计肉食中的细菌数量。在金黄色葡萄球菌的检测中，细胞浓度为 10^3～10^8 个/mL时，检测时间为 2h；而细胞浓度为 2 个/mL 时，所用时间为 12～13h[102]。流动型微量量热计作为检测设备，用于解冻 3h 后酿酒酵母恢复的活细胞计数[112]。当用于肉末检测时，含菌体 10^5～10^8cfu/g 的样品在 24h 内可记录其产热率（HPR）高峰，结果与平板计数相似[65]。当细胞浓度为 10^2cfu/mL 时，6h 后产生 HPR，在 10h 形成 HPR 高峰。

11.1.3 流动型血球细胞计数法

流动型血球细胞计数法是用于菌悬液中细胞计数和各细胞特性检测的技术。此方法的本质是使悬浮细胞一个一个的经流动槽到检测器。射流装置限定了经过检测器的细胞的流速和轨道，可检测的细胞特性有荧光性，吸光性和光散射性。通过使用流动分类器，可根据各种细胞的特性将其分类，可以测量细胞的一种到 3 种或更多球形特性[119]。流动型血球细胞计数器和细胞分类器，利用一种或更多种激发源如氩、氪、氦-氖离子激光以及荧光染料可以在 1s 内检测和鉴定几千个细胞。当使用一种染料时，它的激发光谱必须与激发源的光波长相匹配[40]。在检测中两种染料可联合使用，例如在总蛋白和 DNA 含量的测定中，使用两种染料。两种染料必须在同一波长下激发，散发不同的波长，使得每一染料的散射光可分别测量。Horan 和 Wheeless 对流动血球细胞计数法的早期发展做了总结[74]。

人们对哺乳动物的细胞做了大量研究的同时也对酵母细胞中的 DNA 和蛋白质含量进行了测定。酵母细胞经生长和固定后，在 RNA 酶溶液中恒温保持 1h。可用荧光性异硫氰酸盐染色细胞蛋白，DNA 可用内基碘化物染色。经过冲洗后，染色细胞悬浮于适当的缓冲液中，然后经流动血球细胞计数器检测。Hutter 等人[76]曾使用配有 50mW 氩激光的设备。酵母细胞在光谱过滤器不同波长的光中被激发。通过此方法测定面包酵母，发现每个细胞中含 4.6×10^{-14}g DNA，含蛋白质 1.1×10^{-11}g。

当流动型血球细胞计数法与荧光标记的抗体相联合时，40min 内就可以检测到牛乳和鸡蛋中的鼠伤寒沙门氏菌，灵敏度可达 10^3 个/mL[115]。当经过 6h 的非选择性富集，牛乳中的检测限度为 10 个/mL，鸡蛋中为 1 个/mL。

11.2 化学方法

11.2.1 热稳定性核酸酶

通过检测食品中热稳定性核酸酶（DNAse）的含量可以精确计算出金黄色葡萄球菌的数量。这是因为金黄色葡萄球菌菌株的凝固酶与热稳定性核酸酶的产生有密切的关系，特别是肠毒素生产菌株。例如，在一项研究中发现，250 株肠毒素菌株中有 232 株（93%）产凝固酶，242 株（95%）产热稳定性核酸酶[101]。在第七部分 20 中将介绍产 DNAse 的非金黄色葡萄球菌菌株。

Chesbro 和 Auborn[30]首先进行了食品中热稳定性核酸酶的检测，他们使用分光光度法对核酸进行鉴定。在实验时发现随火腿三明治中细胞数量的增加，葡萄球菌的热稳定

性核酸酶的含量也在增加。研究者认为当有 0.34 单位的热稳定性核酸酶存在时，表明有某种葡萄球菌生长，但此时肠毒素的含有量还不会使食品有毒性。0.34 单位的核酸酶含量相应于金黄色葡萄球菌菌株 234 产肠毒素 $9.5\times10^{-3}\mu g$。许多实验证明热稳定性核酸酶是金黄色葡萄球菌生长的标志。凝固酵素是产肠毒素菌株存在的标志[126]，含肠毒素的食品中也含有热稳定性核酸酶，此时的食品大多含有 1×10^{6} 金黄色葡萄球菌/g[134]。另一方面，一些球菌也产生热稳定性核酸酶。在从牛乳中分离得到的 728 种球菌中，有 30% 产核酸酶，有 4.3%呈热稳定性核酸酶阳性[9]。

产肠毒素菌株和不产肠毒素菌株的热稳定性核酸酶的产量分别为 19.4 和 25.5μ/mL[126]。当细胞数达到 $10^{5}\sim10^{6}$ 时才能检测到核酸酶，而细胞数$>10^{6}$ 时才能检测到肠毒素[196]。当热损伤细胞在胰酶解酪蛋白黄豆肉汤中恢复时，核酸酶含量增加，但恢复后核酸酶含量又降低[176]。核酸酶降低的原因是蛋白水解酶的形成，通过添加蛋白酶的抑制因子可以防止核酸酶含量的降低。

将热稳定性核酸酶作为金黄色葡萄球菌生长和活性标记物的优点如下：

①由于酶具有热稳定性，在细胞受到热、化学因素、病原体等因素影响时，核酸酶仍然存在；

②检测热稳定性核酸酶要比检测肠毒素快[176]；

③产肠毒素的细胞在产生肠毒素前会先产生核酸酶（图 11.2）；

④检测核酸酶时不须浓缩样品，但肠毒素需要经样品浓缩才可检测；

⑤核酸酶和肠毒素一样都具有热稳定性。

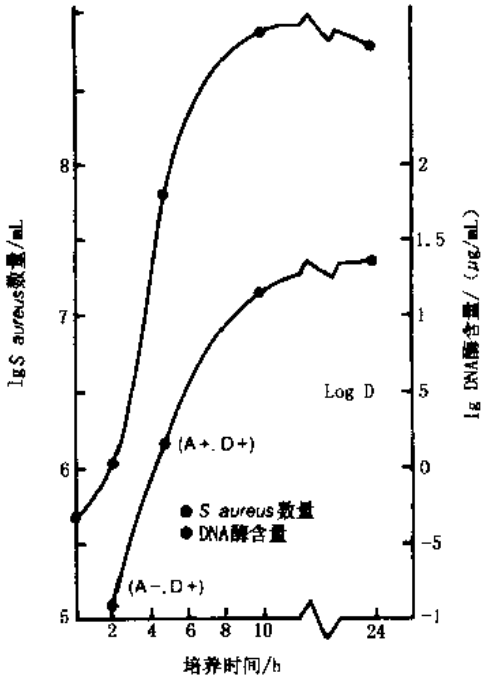


图 11.2　37℃时在 BHI 液体培养中 *S. aureus* (196E) 的生长，DNA 酶的生成以及内毒素的生成。菌体量为 2×10^{6} 时 4h 内对 DNA 酶和内毒素的检测，4h 后在菌体浓度更高时检测内毒素 A 的含量。DNA 酶在未浓缩的培养液中检测，在浓缩 50 倍的培养液中检测内毒素

尽管表皮葡萄球菌和一些微球菌都产生核酸酶，但这些核酸酶的热稳定性不如金黄色葡萄球菌产生的核酸酶[101]。热稳定性核酸酶可在沸水中 15min 不变性，在 BHI 肉汤培养基中 pH8.2 下的 D_{130}为 16.6min，Z 值为 51[58]

11.2.2　Limulus 内毒素溶解液

革兰氏阴性菌可以通过其产生内毒素情况来鉴定，内毒素组成了细胞膜的脂多糖（LPS）层（外膜）。LPS 是高热产物，其产生伴随着革兰氏阴性菌的一些感染症状。

Limulus 变形细胞溶菌素（LAL）实验中所使用的溶菌蛋白是来自 Limulus polyphemous 的血细胞（淋巴血变形细胞），溶菌蛋白对内毒素来讲是最敏感的物质。由 5 个企业

进行的 6 个 LAL 制备实验中发现：内毒素对溶菌蛋白的敏感性为美国 Pharmacopeia 进行的兔子热原实验的 3～300 倍[186]。LAL 实验是将液体食品样品或其它的实验材料加入少量的溶菌素中，37℃恒温培养 1h。内毒素的存在使得溶菌物质形成胶体。LAL 试剂可检测 1.0pg 的 LPS。由于大肠杆菌细胞中含有 3.0fg 的 LPS，它可以检测 300 个革兰氏阴性菌细胞。在鲜肉的假单胞菌研究中，可检测 10^2cfu/mL[50]。人们总结了食品微生物检测中所用的各种 LAL 方法[33,87]。

LAL 首次在食品上是用来检测牛肉中的腐败细菌[82,83]。革兰氏阴性菌活细胞数增加则内毒素含量就会增加[86]。冷冻鲜肉的腐败是由革兰氏阴性菌引起的，LAL 实验是快速检测革兰氏阴性菌数量的好方法。此方法还可用于牛乳消毒前后的大肠杆菌卫生标准快速检测[179]。鲜牛乳和巴氏消毒的牛乳经检验可知革兰氏阴性菌的含量。由于 LAL 可检测革兰氏阴性菌的活性和非活性细胞，所以必须同时进行平板培养才可得到活性菌落数量。此方法已成功用于牛乳、牛乳制品[81,195]的检测、鲜鱼的微生物质量检测[178]以及火鸡质量的检测。后来人们发现在真空包装食品中 LAL 的含量与细菌数量成精确的线性关系[48]。

LAL 含量可通过直接连续稀释或 MPN 方法测定，这两种方法的结果十分相似[162]。从食品中提取内毒素时，使用 Stomacher 比 Waring 搅拌器和震荡稀释瓶的效果要好[53]。

在实验中，Limulus 的蛋白凝结酶要经过纯化。它是一种丝氨酸蛋白酶，分子质量大约为 150 000u。当此酶被 Ca^{2+} 和内毒素激活时，蛋白质发生凝结。Limulus 的抗脂多糖因子相对分子质量为 24 500。当 Limulus 凝结酶作用抗脂多糖因子时，它就分解为含 45 个氨基酸残基的可溶性多肽链和含 170 个氨基酸残基的不可溶性多肽链。后者内部发生-精氨酸 赖氨酸或精氨酸-甘氨酸的连接而形成凝结[178]。这一过程在参考文献[124]中有详细介绍，下文中也将对此进行解释。

在工业生产中所用的原料含有的氨基酸序列可能与抗脂多糖因子中的氨基酸序列相似。内毒素作用的发光物质与 *p*-硝基苯胺相连。当内毒素激活酶作用发光物质时，*p*-硝基苯胺游离，在 405nm 处可以读出。发光物质的游离量与样品中内毒素的含量成正比。通过使用发光物质，Tsuji 等人[182]设计了一种内毒素自动分析方法，此方法测量灵敏度为 30pg 内毒素/mL。

假设内毒素含量和革兰氏阴性菌数量的比值恒定，并假设所有菌属的细胞数量相同，实验检测的内毒素就可从计算的细胞数（活性和非活性）量中推算出来。进一步假设革兰氏阴性菌和革兰氏阳性菌的数量比为定值，那么可在 1h 内得到食品中的细菌总数[84]。实验结果低表明食品合格，而实验结果高的食品还须进行其它方法的检测。

LAL 实验的价值就在于得到结果所须要的时间，LAL 高的食品首选进行其它方法的进一步检测；LAL 低的食品应立刻放入没有革兰氏阴性菌感染的地方。

11.2.3 三磷酸腺苷（ATP）的测定

三磷酸腺苷（ATP）是所有生命体的主要能源。它在细胞死亡 2h 后消失，每个细胞中的 ATP 含量恒定，大约为 10^{-18}～10^{-17}mol/细胞，相应的每 10^5cfu 含有 4×10^{-4}mol/L 的 ATP[181]。在原核生物中，处于对数生长期的细胞的 ATP 含量为 2～6nmol/mg 细胞干

重[92]；在瘤胃细菌中，平均细胞质含量为 0.3fg/细胞，在瘤胃原生细胞中含量偏高[131]。细胞中 ATP 的测量和提取方法可用于各种微生物菌群。

一种简单的 ATP 检测方法是利用荧火虫的荧光素-荧光素酶系统完成的。当 ATP 存在时，荧光素酶发光，可用液体发光分光计和照度计测量。荧火虫荧光素酶的含量与 ATP 添加量成正比[136]。

在医用微生物学中，ATP 检测方法已作为检测微生物数量的快速方法使用。在医学实验室此方法已用于尿样的检查。

成功地在活性污泥中微生物分析中运用[136]表明它可用于食品工业中。它可以快自动速检测食品中的微生物，是一种很有潜力的方法。方法中的主要问题是除去非微生物产生的 ATP。Sharpe 等人[163]曾提出，微生物的 ATP 含量和食品自身含有的 ATP 相同或比之更高，他们发现食品经过储存后自身的 ATP 含量降低（表 11.2）。Thore 等人[181]使用氚 X-100 和腺苷三磷双磷酸酶破坏尿样中的非微生物 ATP，结果 ATP 含量与 10^5 个/mL 的细菌培养液中得到的 ATP 含量十分接近。在肉食的处理中，Stannard 和 Wood[167]使用三步处理过程，即离心、阳离子交换树脂、过滤除去食品中的颗粒，再用 0.22μm 的膜过滤收集菌体。从过滤膜上洗提菌体，用于 ATP 分析，滤膜收集得到的菌体有 70%～80%。在 10^6～10^9cfu/g 的范围内，微生物 ATP 与细胞数量成线性关系。使用三步处理方法，牛肉的检测可在 20～25min 内完成。在另一研究中，分析了 75 个牛肉样品发现当样品在 20℃恒温培养后，lg APC 与 lg ATP 之间有密切关系[95]。在此研究中，ATP/cfu 范围为 0.6～17.1fg，75 个样品中有 51 个样品的 ATP 含有量≤5.0fg。ATP 分析方法已成功应用于海鲜食品的检测和酒类中酵母菌的分析。

表 11.2　　在 37℃培养中 ATP 与活细胞总数的关系[163]

样　品	ATP 和平均活细胞数					
	培养时间 0h		培养时间 6h		培养时间 24h	
	ATP/fg	活菌记数	ATP/fg	活菌记数	ATP/fg	活菌记数
Crinkle 碎片（冷冻）	4.57×10^6 4.21×10^5	4.9×10^2	7.11×10^6 7.69×10^6	1.2×10^3	3.23×10^8 2.62×10^8	5.9×10^8
冷冻豌豆	5.11×10^7 5.43×10^7	4.1×10^4	3.18×10^8 3.54×10^8	1.3×10^7	3.90×10^8 5.23×10^8	7.7×10^8
肉末	1.51×10^7 1.60×10^7	1.3×10^5	3.62×10^6 4.94×10^6	6.4×10^3	7.88×10^5 8.34×10^5	2.2×10^3
牛肉 steaklet（冷冻）	2.75×10^7 4.21×10^7 3.30×10^7	4.3×10^3	6.93×10^6 6.61×10^6	4.1×10^3	6.68×10^6 5.71×10^6	1.3×10^6
牛排（冷冻）	3.92×10^7 1.89×10^7	3.1×10^4	5.65×10^6 4.39×10^6	3.2×10^3	3.76×10^6 3.70×10^6	2.2×10^5
鳎鱼鱼片（冷冻）	8.99×10^6 9.33×10^6	1.7×10^4	1.15×10^7 1.28×10^7	4.4×10^5	1.28×10^7 1.89×10^7	3.4×10^5
鱼鳍（冷冻）	1.96×10^8 1.79×10^8	6.0×10^5	6.08×10^7 4.26×10^7	2.2×10^6	1.38×10^9 1.56×10^9	6.4×10^6

ATP 分析方法已用于鸡肉、牛肉和猪肉的检测中[165]。鸡肉经漂洗后检测，在 10h 内就可得到结果，但由于食品中本身含有的 ATP，当细菌数$<1\times10^4$/mL 时检测结果不准确[70]。检测牛肉时，使用不含 ATP 的海绵棉拭 500cm^2 的表面，而检测猪肉时棉拭 50cm^2 的表面。整个实验在 5min 内就可以完成，牛肉的最小检测菌体数为 lg2.0cfu/cm^2，猪肉的最小检测菌体数为 lg3.2cfu/cm^2[165]。

11.2.4 辐射测量法

用辐射线测定微生物方法是以^{14}C 标记培养基中的可代谢物质为基础，微生物在利用这些物质时有$^{14}CO_2$ 释放，再利用放射能计数器检测。当检测利用葡萄糖的微生物时，通常使用^{14}C-葡萄糖。当检测不利用葡萄糖的微生物时，则使用^{14}C-甲酸盐或^{14}C-谷氨酸盐。在处理过程中使用 50mL 有盖的血清药瓶，内装 12～36mL 含已标记的可代谢物的培养基。药瓶中可为好氧条件也可充入气体形成厌氧条件，然后接种样品。药瓶中的预留空间可用于检测$^{14}CO_2$ 的存在。检测$^{14}CO_2$ 所须的时间与食品中微生物的含量成反比。

Levin 等人[106]首先提出的使用辐射线测定微生物的方法。该方法主要用于医用微生物，有时也用于食品和水中微生物的检测。Previte[148]对牛肉中的金黄色葡萄球菌、鼠伤寒沙门氏菌、肉毒梭菌和腐败厌氧菌 3679 的孢子进行了研究分析[148]。培养基中的菌体含量范围 10^4～10^6/mL，检测时间为 2h（鼠伤寒沙门氏菌）到 5～6h（肉毒梭菌孢子）。此研究中使用了 0.0139μmL Ci ^{14}C-葡萄糖/mL 的黄豆肉汤培养基。在另一研究中，Lampi 等人[102]发现使用辐射线方法可在 9h 内完成细胞浓度为 1 个/mL 的金黄色葡萄球菌或鼠伤寒沙门氏菌的检测。当细胞浓度为 10^4 个/mL 时检测需要 3～4h。腐败厌氧菌 3679 的孢子含量为 90 时，需要的检测时间为 11h，数量为 10^4 时需要的时间为 7h。研究者发现孢子的检测时间通常比活细胞的检测时间长 3～4h。从 Lampi 等人的发现中可知，辐射线检测适用于微生物含量高的食品检测，一般需要 5～6h，而微生物含量低的食品则需更长的检测时间。

当使用^{14}C-甲酸盐或^{14}C-谷氨酸盐时，此方法可用于非葡萄糖发酵的微生物的检测。在 1～6h 内可检测出大量的微生物。Bachrach 和 Bachrach[6]使用含^{14}C-乳糖的液体培养基将菌体在 37℃下恒温培养，然后使用辐射线方法检测含有 1～10 大肠杆菌的液体，可在 6h 内就得到结果，可以想象在 37℃和 45℃培养的样品中大肠菌的检测值是不同的。

辐射线方法曾用于冷冻浓缩橘子汁中微生物的检测[70]。实验中使用 4 种酵母菌和 4 种乳酸菌，菌体含量为 10^4 个，检测中采用^{14}C-葡萄糖，在 6～10h 内可得到结果。在 600 种检测样品中，44 种样品检测时间为 12h，41 种检测时间为 8h。实验结果中没有假阴性，仅有 2 个假阳性结果。此方法可用于检测烹调食品中微生物含量是否$<10^6$cfu/mL，在 7 类食品的 404 个样品中，有 75%可在 6h 内检测出是否为合格食品[156]。检测结果中有 5 种出现错误。研究中使用了^{14}C-乳糖、谷氨酸和甲酸钠。

11.2.5 荧光和发光法

在食品微生物的培养基中使用的发光和荧光物质有：

①4-methylumbelliferyl-β-D-葡糖苷酸（MUG）

②4-methylumbelliferyl-β-D-半乳糖苷（MUGal）

③4-bromo-4-氯-3-indolyl-β-D-葡糖苷酸（X-GLUC）

①o-nituophenyl-β-D-galactopyranoside（ONPG）

⑤5-bromo-4-氯-3-indolyl-β-D-gluvuronide（BCIG）

⑥L alanine p nitroanilide（LAPN）

前三种物质可产生荧光基质，其他物质为发光基质。这些物质可在平板培养基、MPN肉汤和膜过滤方法中使用。MUG是应用最广泛的荧光物质，它被β-D-葡糖苷酸酶水解释放出有荧光的4-甲基-umbelliferyl部分在长波长紫外光下可以检测。大肠杆菌是GUD的主要生产菌。MUG物质被广泛应用于检测大肠菌的培养基中。有一些沙门氏菌和棒状菌也是GUD的生产菌。

最早使用MUG检测大肠杆菌的是Feng和Hartman[52]，他们在实验中使用了十二烷基色糖肉汤培养基（LTB）和其它的大肠菌选择性培养基，结果发现在LTB-MUG中含有一个细胞可在20h内检测发现。由于需要10^7个大肠杆菌细胞才能有足够的GUD以使MUG达到可检测程度，因此检测时间与细胞数有关。大多数阳性菌株的反应在4h完成，有一些GUD弱阳性菌株反应需要16h。此方法的重要特点是在代谢乳糖产生气体前就形成荧光物质。应用Feng-Hartman方法通过三试管MPN技术检测1020样品，其结果好于传统MPN技术[185]。影响LTB-MUG方法结果的主要因素是有一些大肠杆菌是厌氧菌。实验没有假阴性结果，在十二烷基硫酸盐液体培养基（LSB）中添加MUG用于实验，实验结果为270个样品中有94.8%结果一致，4.8%为假阳性结果，没有假阴性结果出现[173]；在对牡蛎的研究中，使用EC培养基-MUG方法检测103个荧光试管中有102个成大肠菌阳性；对682种大肠杆菌培养物进行MUG实验，有630种成阳性[180]。在188个大肠杆菌0157菌株的实验中，166个成MUG阴性，全部成Vero阳性，但使用20min方法检测时，MUG阴性大肠杆菌都成Vero阳性[180]；在对软体贝类动物食品的检测中发现，使用EC-MUG方法，MUG用量为50μL/L，95%的大肠杆菌为阳性，11%为假阴性[150]。与AOAC中用于检测大肠杆菌的方法相比，LST-MUG比其它方法效果好[147]。

MUG仅被作为荧光物质使用，但在有项研究中它被用于膜过滤方法检测水中的大肠菌含量，最低含量为1cfu/100mL时检测时间为6h[116]。与其相似的物质，4-methylumbelifrone-β-D-半乳糖苷则被用于检测球菌[110]。检测中还使用染色淀粉，两种物质加入球菌的选择性培养基中，通过淀粉的水解和荧光性，从环境中得到的86%的球菌被成功区分出来。

X-GLUC被用于检测大肠杆菌的平板培养基中[59]。在蛋白胨-表面活性剂的琼脂培养基中添加此物质500μL/L，在24h内大肠杆菌产生蓝色，蓝色并不是从菌落中散出，也没有荧光，当以50个牛肉样品做实验材料，与三试管标准MPN相比，结果相似[154]。

ONPG是一种发光物质，适用于大肠杆菌的检测。这种物质可被β-葡糖苷酸酶水解产生黄色可在420nm测量。为了鉴定水中的大肠杆菌，通过0.45μm膜富集菌体，在EC培养基中恒温培养1h，然后添加过滤除菌的ONPG。再在45.5℃培养至颜色可在420nm检测时为止[157]。ONPG的灵敏性与MUG相似，大约需要10^7个细胞能达到可测量程度。ONPG被用于检测水中是否存在大肠杆菌[46]。使用这一方法，含有大肠杆菌的试管成黄

色。检测大肠杆菌时，每个试管用可调荧光灯观察（366nm），含有大肠杆菌的试管发出亮荧光。Colilert 和 Coliquik 系统中以 ONPG 和 MUG 作为惟一营养物质，所有大肠菌生长都呈现黄色，大肠杆菌可用 MUG 荧光显示。

BCIG 可使大肠杆菌菌落成蓝色，而其它微生物不显蓝色。当使用 100μL/L 十二烷基 tryptose 琼脂培养基时，1025 株大肠杆菌仅有 1%不成蓝色，583 株非大肠杆菌菌株中有 5%成假阳性[188]。平板在 35℃下培养 2h，然后在 44.5℃培养 22～24h。

LAPN 用于单兰氏阴性菌的检测前提是氨肽酶可作用于此物质。酶切 L-丙氨酸-*p*-硝基苯胺形成 *p*-硝基苯胺，此黄色物质可通过分光光度计在 390nm 检测[28]。当用于检测肉食中的革兰氏阴性菌时，最低检测量为 10^4～5×10^5/cfu[41]。当菌体量为 10^6～10^7cfu/cm^2 时，检测时间为 3h。Limulus 实验对革兰氏阴性菌进行了更多的研究，它可在 1h 内得到结果。

11.2.6 荧光素酶发光基因（Lux）

在费氏弧菌和哈氏弧菌菌体中的发光物质受基因的控制，通过转移这些基因可使其它微生物具有产生发光物质的能力。主要的荧光素酶基因（命名为 lux）为 luxA 和 luxB，前者编码荧光素酶的 α 亚单位，后者编码 β 亚单位。位于微生物操纵子上的其它 8 个基因不用转移。有关 lux 系统的遗传学和生物化学在参考文献[118,168]中有详细介绍。

在食品微生物学的应用 lux 是从细菌噬菌体开始的，充分利用了噬菌体与宿主之间的特殊关系（见第六部分 18 中有关噬菌体的部分）。以小肠结肠炎菌为实验菌种，选择一种噬菌体可以感染大量菌株，但不会感染相关的其他菌种。通过再结合的方法使 lux 基因插入噬菌体内，此基因含有 2kbDNA。但是这些转化噬菌体缺少产光的成分，因此其自身并不能发光。当加入宿主细菌时，含有 lux 基因的噬菌体吸附、增殖，通过增加 lux 基因使宿主细胞发光。发光反映所须的物质如下方程所示：

$$FMNH_2+RCHO-O_2 \xrightarrow{\text{荧光素酶}} FMN+RCLLH+H_2O+光$$

在反应中，$FMNH_2$ 被还原为黄素单核苷酸和 RCHO（长链脂肪醛如十二烷基醛）。发出的光可通过照度计检测。测量时间取决于噬菌体吸附宿主细胞和增殖所用的时间，一般为 30～50min。

Ulitzur 和 Kuhn[184]首先实验了将 lux 基因加入噬菌体染色质中。此方法可检测肉食中肠细菌的含量，可检测每平方厘米鲜肉表面细菌 10^4cfu/g[98]。大量的研究表明在含沙门氏菌的样品检测中 1h 就可得到结果。使用 MPN 方法[183]检测含有鼠伤寒沙门氏菌浓度为 1 个/100mL 的液体时，大约需要 24h。Lux 基因方法可广泛应用于食品微生物的检测，如果样品中微生物含量低要经过富集步骤后再进行检测，但此方法不适用于革兰氏阳性菌，因为其产生的光比革兰氏阴性菌弱 100 倍[168]。

11.3 食品微生物的“指纹”识别和鉴定

食品中微生物的鉴定有大量的方法：

①血清学方法

②噬菌体方法
③基因探针方法
④多位点酶电泳方法
⑤多聚酶链反应方法
⑥限制酶分析方法
⑦脉冲场凝胶电泳方法
⑧限制长度多态片段
⑨随机扩增多态 DNA 方法
⑩核酸方法

除了血清学和噬菌体方法，其他为分子生物学方法，它们在食品微生物上的应用还在进一步研究和发展中。

11.3.1　血清学方法

血清学方法广泛应用于革兰氏阴性菌的检测，如大肠菌和沙门氏菌。在革兰氏阳性菌中，血清学方法对李斯特氏菌属的检测极为重要。血清学方法的实质是用特殊抗体鉴定同源抗原。在许多食品病原体中，抗原是很微小的，需要凝集。一些可溶性抗原如毒素，需要采用胶体扩散的方法凝集。

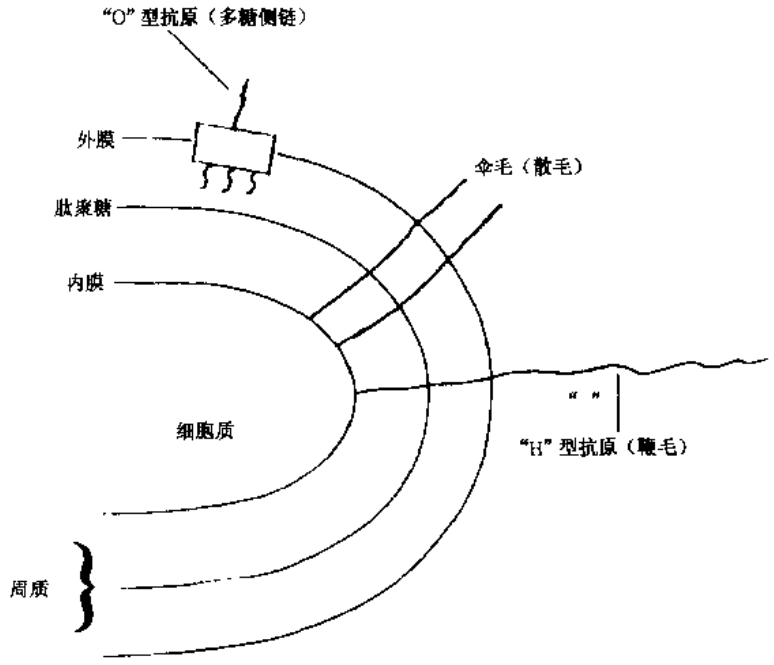


图 11.3　革兰氏阴性菌细胞部分放大图，
表示"O"型加"H"型抗原的相关位点

在图 11.3 中绘出了肠细菌的"O"和"H"抗原。早在 20 世纪 40 年代，Kauffmann 就开始对沙门氏菌进行血清学分类[83]。他定义和计数了前 20 种 O 型菌。分类是依据对 3

种抗原位点的认识，即体细胞（O［"oh"］，Ger.，"ohne"）、K（Ger.，kapsel，荚膜）、和鞭毛（H，Ger.，"hauch"）。O 抗原组成 O 多糖侧链，暴露于表面（如图 11.3）。这些不同结构和抗原种类的鉴定是以糖链的连接和组成为依据的。突变会影响到糖链的组成和连接，从而产生新的 O 抗原。人们已经知道沙门氏菌的 2324 种 O serovar，大肠杆菌大约有 200 多种 O serovar。O 抗原的热稳定性很好，而 K 和 H 抗原的热稳定性较差。由于鞭毛蛋白比糖侧链种类少，因此 H 抗原的类型很少，大肠杆菌大约有 30 种 H 抗原存在。

对于李斯特氏菌，有 15 种 O 抗原，5 种 H 抗原（a-e）。O 抗原的决定物是胞壁酸，也许还有细胞膜脂胞壁酸[73]。

11.3.2 噬菌体类型

噬菌体类型方法是以噬菌体和它的宿主细菌之间的特殊关系为基础的，利用这种特殊关系，人们可以用已知的噬菌体鉴定其特定的宿主细菌。所有的食品病原体都可以用噬菌体方法鉴定。在各部分中都有关于食品中病原体和相应噬菌体的介绍。

最早和最详细的噬菌体鉴定方法是在 20 世纪 50 年代发展的用于金黄色葡萄球菌鉴定的方法。尽管葡萄球菌噬菌体的使用已经减少，但它是研究单核细胞增生李斯特氏菌流行病学的重要工具。

自从李斯特氏菌噬菌体在 1945 年被发现后，大量的研究将其用于菌种和菌株的鉴定以及流行病的研究。李斯特氏菌含有 dsDNA，有两种类型：Siphoviridae（非收缩性尾巴）和 Myoviridae（收缩性尾巴）。1958～1978 年间，在法国研究了单核细胞增生李斯特氏菌 823 株菌株 69.4%是血清类型 4，通过 12 种主要噬菌体和 3 种次要噬菌体建立了噬菌体鉴定系统。6 种噬菌体用于鉴定血清型 1，9 种用于鉴定血清型 4，两种用于鉴定血清型 2。通过使用 20 种噬菌体可以鉴定 823 个菌株中的 78.4%株，有 88%的血清型 4 菌株和 57%的血清型 1 菌株得到鉴定。要鉴定 645 个菌株中的 552 个，需要 8 个主要噬菌体[45]。在多渠道研究中，使用了 29 种噬菌体，77%血清型 4 和 54%的血清型 1/2 得到了鉴定[105]。Audurier 等人将噬菌体分为三类：用于血清型 1/2 菌株的 12 种噬菌体、用于血清型 4b 菌株的 16 种噬菌体和用于其他菌株的 7 种噬菌体[13]。1985～1987 年，法国研究者利用 35 种噬菌体将 826 个血清型 4b 菌株和 1644 个血清型 1/2 菌株中的 84%和 49%进行了鉴定。利用此方法研究得知，从人类李斯特氏病，家畜和食品中分离得到的单核细胞增生李斯特氏菌都属于一种噬菌体型。

在 127 个单核细胞增生李斯特氏菌的分离菌株的研究中，溶菌素允许使用 8 个噬菌体群，但结果表明溶菌试剂是单核细胞增多性李氏杆菌素，它是一种没有头部仅有尾部的噬菌体[132]。尽管它与血清型有关，但与来自动物体的单核细胞增生李斯特氏菌没有关系[177]。

1967～1984 年，在英国从人类疾病中分离得到 807 种单核细胞增生李斯特氏菌菌株，在此研究中，噬菌体鉴定对于检查病人李斯特氏病的来源是一种有用的工具[177]。这 807 种微生物属于血清型 1/2，3，4。在另一研究中使用了来自溶源和环境的 16 种噬菌体、5 个菌种的 464 个菌株被分为 4 种类型[112]。尽管结果的重现性很高，但菌种和血清

型与任何溶菌型都不相符。噬菌体对单核细胞增生李斯特氏菌的敏感性分别为：血清型4为98%，血清型1为90%，血清型3为10%。没有一种噬菌体对溶菌型菌种和血清型敏感。格氏李斯特氏菌不被任何噬菌体所溶解[112]。使用一套21种属-种鉴定噬菌体系统，对1087种李斯特氏菌菌株的鉴定率为89.5%。

大多数噬菌体的溶菌光谱很广，这表明这些微生物的受点较普通。由于没有溶菌型和血清型同时存在的可能性，O型抗原的决定物质和噬菌体受点结构并不相同。

从食品中毒病例中分离得到166个蜡状芽孢杆菌菌株，用12种噬菌体的鉴定系统对其中的97%的菌株进行鉴定[1]。有趣的是，大多数苏云金芽孢杆菌菌株能通过同一噬菌体系统得到鉴定。

11.3.3 基因（DNA）探针技术

DNA探针是来某微生物的某段DNA序列，用于检测同原DNA或RNA序列。实验中DNA必须与研究菌株发生杂交，探针含有编码特殊产物的基因序列。探针DNA必须通过某种方法进行标记以观察杂交是否发生。放射性同位素是应用最广的标记物，如^{32}P、^{3}H、^{125}I、^{14}C，其中^{32}P是最常用的。指示物有碱式磷酸酯酶、过氧化酶、荧光素、半抗原、生物素和毛地黄毒苷[44]。一些指示物方法使用时会限制探针的使用数量。当使用生物素时，要用抗生物蛋白酶、抗生素、发光素来检测。染色体DNA是目的核酸的来源，但在一个细胞中通常只含有一个目的核酸，mRNA，rRNA和质粒DNA可提供更多的目的物，形成更灵敏的检测体系。寡核苷酸的合成需要20～50个碱基，在合适的条件下，杂交时间为30～60min。

探针技术的典型应用是用限制性核酸酶来制备未知DNA的片段。经过电泳分离得到片段，然后转移至纤维素硝酸盐过滤膜，与标记探针杂交。经过小心冲洗除去未反应的探针DNA，通过自动射线摄影术分析放射性标记物。

使用探针技术可检测的最小细胞数量为10^6～10^7，也有报道可检测10^4细胞。由于食品中的目标细胞含量可能仅为1cfu/mL，要使用探针技术就必须进行细胞富集，使细胞数达到可提供足够DNA的含量。当细胞数为10^8时，使用放射性标记物进行DNA探针检测，大约需要10～12h。当要进行细胞富集时，分析时间为富集时间和探针分析时间之和，大约为44h。

下面讲述了探针技术用于食品微生物检测的一些例子（在参考文献[176]中有详尽介绍）：

①使用毛地黄毒苷标记的探针检测鲜牛肉中的内毒素菌产气夹膜梭菌，菌体数≤10cfu/g时检测时间为48h[7]；

②将染色体DNA探针技术与FDA培养方法相比，实验菌为乳制品，肉食和海洋食品中的单核细胞增生李斯特氏菌[20]。在660个乳制品和海洋食品样品中，FDA技术检测有354种为阳性，探针检测中有393种为阳性。在540种肉食样品分析中，FDA检测有261种为阳性，探针检测有378种为阳性。探针检测结果可在48h内得到，而FDA/USDA方法需要3～4d才能完成；

③利用比色分析探针检测沙门氏菌菌属，110个样品得到正确分析，61种非沙门氏

菌没有得到假阳性结果；

④对 269 种家禽肉和水样中的沙门氏菌使用放射性探针技术进行检测，当使用两次富集后，可检测到的细胞浓度为 0.03 个/mL[79]。AOAC 已证明通过探针技术，可检测的细胞浓度为 10^4 个/mL；

⑤由编码 SEB 和 SEC 的 207～219 氨基酸的 DNA 构成的探针用于检测金黄色葡萄球菌内毒素，与 SEB 的基因和 3 种 SEC 内毒素发生反应[130]。

菌落杂交中用 DNA 探针技术，就是将目的微生物富集于薄膜上，然后将膜放在琼脂培养基上培养，使微生物菌落直接在薄膜上形成。原平板的复制品形成复制平板，在复制平板薄膜上生长的菌落被直接溶解，释放出核酸，将 DNA 转为单链。一些 DNA 被转移到硝酸盐纤维素滤膜，同标记 DNA 或 RNA 探针杂交。传统的 DNA 菌落杂交技术得到改进，每一个滤膜可供 48 个微生物使用，总共可使用 60 个滤膜[94]。

由 Grunstein 和 Hogness[66]改进的菌落杂交技术被成功应用于单核细胞增生李斯特氏菌、内毒素大肠杆菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌的检测。在某项研究中合成了多核酸探针，多核酸探针与大肠杆菌的 ST 内毒素基因区域同原，通过 DNA 菌落杂交检测产内毒素的菌株[73]。菌落放于滤纸上，使胞内 DNA 变性，在 40℃过夜杂交，然后放射能摄影。此方法可检测最少的产 ST 细胞数为 10^5。在同一实验室的早期研究中，菌落杂交技术用于污染食品的大肠杆菌检测，实验不经膜富集可检测数量为 100～1000 个/g，或 1～10 个细胞/滤膜[71]。

菌落杂交技术和 dot blot 分析用于食品和动物粪便中的大肠杆菌 StxI 和 StxII 的检测，前者可检测最少量为 1.3cfu/g，时间为 3～4d，而后者可在 24h 内检测大肠杆菌的出血大肠炎菌株，但此方法不能检测 slt 基因[108]。Wolcott 总结了大量的核酸探针技术信息和一些特殊的探针方法[198]。

11.3.4 DNA 扩增法（PCR 多聚酶链反应）

这一技术是由 Kleppe 等人在 1971 年首先提出的[96]，它在食品微生物鉴定中广泛应用。目前应用最多的是由 Perkim Elmer-Cetus Corp 的科学家改进的技术[157-170]。由于对 PCR 技术的贡献，L. B. Mullis 在 1993 年得到了诺贝尔化学奖。此技术中利用了热稳定性 DNA 多聚酶和 5′-及 3′寡核苷酸引物，经一套扩增循环将一个单分子 DNA 扩增到 10^7 分子。然后将扩增 DNA 经琼脂糖凝胶电泳或与放射标记或非标记探针进行 Southern 杂交。这一技术在食品微生物中的应用总结如下：

①分别用 PCR 技术和免疫荧光技术检测水样中 Cryptosporidium 卵囊，结果 PCR 技术灵敏性高，可检测含 1～10 个卵囊的样品[88]；

②在其他微生物含量＞10^9 个的粪便样品中可检测到细胞浓度＜10 个/mL 的产 Stx 的大肠杆菌[135]；

③使用一个 24 单位引物可检测大肠杆菌浓度 1～5 个/100mL 水样；

④PCR 技术可检测 1～10cfu 的单核细胞增生李斯特氏菌，但不适用于奶酪食品；

⑤通过使用溶菌素-溶血素 519bp 基因可检测牡蛎食品中的创伤弧菌，在 24h 内可检测最少量≤10^2cfu/g[72]；

⑥在 PCR 分析中通过使用一种荧光探针可在 3h 内完成对 5cfu 的单核细胞增生李斯特氏菌的检测[8]。使用荧光探针可监测目的 DNA 的扩增，荧光强度随 PCR 产物的增多而增强。

11.3.5 多位点酶电泳方法（MEE）

此技术通过检测一套水溶性胞内酶的电泳迁移率关系来估测各微生物菌株在菌种范围内的遗传关系。菌种的等位基因和遗传变化引起电泳迁移率的变化。研究者曾在淀粉凝胶上进行了 15～25 个酶电泳实验。由于同一菌种的不同菌株的一些酶具有不同的电泳迁移率，MEE 可用于流行病学中菌株的鉴定。这一技术在参考文献[160]中有详细讲述。现将一些应用总结如下：

①在 175 种单核细胞增生李斯特氏菌分离菌株的研究中检测 16 种酶的等位基因，45 个等位基因或 MEE 型得到鉴定[146]，可分为血清型 4a，4b，1/2b；

②研究确定普通来源的单核细胞增生李斯特氏菌菌株的 MEE 类型比特殊来源的类型少。例如从 1983 年的 Massachusetts 的牛乳中分离的 7 个菌株为一个 MEE 类型，而从 Philadelphia 的分离的 22 个菌株中有 11 个 MEE 不同类型[18]；

③在丹麦不同来源的 245 个单核细胞增生李斯特氏菌菌株研究中，有 33 个 MEE 类型，73%的菌株属于两种 MEE 类型中的一种[128]。在食品中有一种 MEE 类型最为常见；

④与限制性多态片段（RFLP）技术相比，两种方法的分析结果相似[69]；

⑤通过 MEE 分析比较霍乱弧菌 O139 和 7 种流行病霍乱弧菌菌株发现它们关系密切[90]。

11.3.6 限制酶分析方法

通过此方法将研究菌体的染色体 DNA 用适当的限制性内切酶降解，酶使双链 DNA 在特定核苷酸位点断开。最广泛使用的限制性内切酶为 EcoRI（从大肠杆菌中得到），它可以识别 DNA 中的 GAATTC 碱基序列，并使 GA 断开；另一种内切核酸酶是 HhaI（从流感嗜血菌中得到），可识别 GYPyPuAC（Py 表示任意嘧啶，Pu 表示任意嘌呤），HhaI 的作用位点为 PyPu，它在流行病单核细胞增生李斯特氏菌的研究中有着重要的作用[192]。

使用 HhaI 对一些单核细胞增生李斯特氏菌血清型 4b 菌株的限制性内切酶分析中发现：此方法是一种分类工具同时也可用于流行病的跟踪研究，因此具有重要的价值[191]。在 1985 年加拿大新斯科舍州暴发的流行病中分离得到的 32 种菌种，经限制性内切酶分析发现有 29 种与凉拌卷心菜中的菌株相同。利用此方法，1983 年美国波士顿暴发的流行病中分离得到的 9 种菌种也得到鉴定。从 1985 年美国加利福尼亚州暴发的流行病中分离得到的菌种经限制性内切酶分析发现，这些菌种与奶酪和奶酪工厂环境中的菌种相同[193]。

最近，人们将 REA 和 PCR 技术联合应用于单核细胞增生李斯特氏菌的研究[48]。在对 133 种血清型 4b 菌株和 32 种其它血清型菌株的研究中，PCR-REA 技术将其分为两组，I 和 II，前者包含 37 个菌株，后者包含 96 个菌株。当使用核酸酶 AluI 时，74 种血清型 4b 菌株属于 phagovar2389：2425：3274：2671：47：108：340，被分入组 II。

11.3.7 随机扩增多态DNA技术（RAPD）

随机扩增多态DNA技术（RAPD）是运用PCR技术得到随机扩增多态DNA，然后经电泳作用得到相应的图谱。将细胞富集悬于水中，溶解得到DNA。将10单位的引物和DNA、Tag多聚酶混合，在不断变化的温度中重复PCR循环40多次，然后将产物经过琼脂糖凝胶电泳。用溴化乙锭染色，形成的带形图谱经摄影分析。纯化的DNA不需要RAPD分析也不需要事先得知序列数据。RAPD中热循环30次时间<1.0h，从菌落生长开始到得到分析结果大约需要3h[119]。

大量的研究者将RAPD用于单核细胞增生李斯特氏菌菌株的指纹图谱分析。当分析从家禽肉食加工厂分离得到的289种菌株时，利用RAPD技术。使用10单位的引物，鉴定得到18个图谱，64%的菌株出现为一种图谱[103]。使用同一引物分析鲜牛乳中的单核细胞增生李斯特氏菌菌株得到7个图谱[104]。在以后的研究中，将RAPD与血清学方法联合使用，效果比单独使用两种方法高得多。RAPD比限制长度多态片段技术快，劳动强度小，且不需要纯DNA[104]。

当使用RAPD分析方法和噬菌体方法分别检测从6种不同疾病中分离得到的104种单核细胞增生李斯特氏菌菌株时，98%的结果是相同的，两种可以替换使用[115]。在辨别单核细胞增生李斯特氏菌菌株时，RAPD技术比16S rRNA序列数据分析结果好[39]。使用三种10单位引物、一种引物用于5种单核细胞增生李斯特氏菌菌种的52个菌株的反应可得到34个带形图谱[51]。

11.3.8 脉冲场凝胶电泳（PFGE）

此方法需要用一种或多种限制性酶将染色体DNA降解，通过逆向电泳将限制性片段分离，并使片段在琼脂糖凝胶上溶解。传统的凝胶电泳中，电泳方向为一个方向，PFGE与此相反。PFGE的脉冲时间从1～100s不断变化，这要由电泳分子的大小决定。交流电场使电泳分子改变电泳方向，电泳图谱是脉冲型的。此方法已用于食品中一些病原体的指纹鉴定。

使用两种限制性酶（AscI和Apa）对176种单核细胞增生李斯特氏菌菌株和22种其它李斯特氏菌株进行检测，得到87种图谱，使用ApaI产生的带形数量最大[123]。在另一研究中，使用一种限制性酶检测42种血清型4b单核细胞增生李斯特氏菌菌株，至少形成24种不同遗传图谱[24]。尽管42种菌体都可用PFGE检测分类，但有89%属于噬菌体类型[74]。当用PFGE方法分析从279种人类李斯特氏病中分离得到的血清型4b单核细胞增生李斯特氏菌菌株时，得到34个脉冲图谱，其中89%为脉冲型2/1/3[80]。使用3种限制性酶对1992年法国暴发的流行病中单核细胞增生李斯特氏菌菌株进行检测，发现其基因型与丹麦、美国加利福尼亚州、瑞士暴发的流行病中的李斯特氏病菌相似[80]。

除了单核细胞增生李斯特氏菌以外，PFGE还应用于食品中其它微生物。1994年太平洋西北部暴发的出血性肠炎中的大肠杆菌暴发性和偶发性菌株O157：H7经PFGE鉴定是不同的菌体[91]。PFGE方法还鉴定得到O139血清型霍乱弧菌和O1 El Tor型有密切关系[67]。利用SmaI酶和PFGE技术已推断出3种葡萄球菌菌种的基因型[62]。

11.3.9 限制长度多态片段技术（RFLP）

DNA 限制长度多态片段是用限制性内切核酸酶溶解 DNA 时产生的不同长度的 DNA 片段。细胞内的 DNA 被限制性内切核酸酶降解，然后经过电泳分离，与一个 DNA 探针发生 Southern 杂交。与 MEE 方法相结合，此方法可检测鲜牛乳和非乳制品中的单核细胞增生李斯特氏菌菌株[68]。

11.3.10 核酸方法

从细胞中提取 DNA，用内切核酸酶如 EcoRI 降解，然后通过琼脂糖凝胶电泳将片段分离。分离得到的片段转移到尼龙膜和适当的标记 cDNA 探针杂交，探针来自逆转录酶作用的 rRNA，然后记录化学发光图谱。现已使用的自动核酸型分析系统可同时处理 8 个样品。自动仪器能产生的核酸型与电脑软件中已知微生物的类型相对应。

当使用核酸方法和 MEE 方法对 305 种单核细胞增生李斯特氏菌菌株检测时，产生 28 种核酸型和 78 种电泳型（ETs），菌株被分为两种类型，但没有一种为血清型 1/2b 和 4b。总体讲，MEE 比核酸方法的准确性高。与使用 PFGE 检测 73 株不动杆菌相比，核酸方法使用两种内切核酸酶核酸能够区分出 39 种类型。而 PFGE 却分辨出 49 种类型[161]。

11.4 免疫学方法

11.4.1 荧光抗体法（FA）

荧光抗体法自从 1942 年创立以来，此技术在食品和医学微生物中广泛应用。所给抗原的抗体与荧光物质相结合而带有荧光，当抗体与抗原发生反应时，抗体-抗原体系发出荧光，通过荧光显微镜可以观察。荧光标记物通常为若丹名 B，荧光异氰酸盐和荧光异硫代氰酸盐，后者的应用最广。荧光抗体（FA）技术可采用两种方法，一种直接方法是使用抗原和特殊的与荧光物质结合的抗体（抗原被有荧光标记的抗体包围）；另一种为间接方法，同源抗体并不与荧光物质相连，而使用的同源抗体的抗体与荧光物质相连（抗原被同源抗体包围又被同源抗体的抗体包围，从而带有荧光）。在间接方法中标记物可检测同源抗体的存在，直接方法中标记物可检测抗原的存在。使用间接方法不用为每一检测微生物制备荧光抗体。如果使用 H 免疫血清，FA 技术就不需要沙门氏菌的纯培养物。最常用的共价物是多价沙门氏菌 OH 球蛋白，用荧光异硫代氰酸盐标记，代表体细胞群 A、Z。由于沙门氏菌抗血清体可与相关微生物发生反应，如亚利森那菌，柠檬酸杆菌，大肠杆菌，当检测污染食品时会出现假阳性结果。Cherry 和 Moody[29]总结了 FA 用于医学微生物的发展历史，Ayres[6]和 Goepfert 和 Insalata[64]总结了 FA 在食品中的应用。

俄国研究者最早成功运用了 FA 技术来检测食品传播的微生物，他们检测了牛乳中的沙门氏菌。此方法曾成功地用于许多不同的食品中的沙门氏菌的检测。但是，分子检测技术的发展使 FA 的应用减少了。

11.4.2 血清富集技术

使用富集血清学技术检测食品中的沙门氏菌（ES）比传统培养方法（CCM）要来得快速。此方法由 Sperber 和 Deibel[166]创建，分为四步；在非选择性培养基中预富集 18h；在亚硒酸盐-半胱氨酸或连四硫酸盐肉汤培养基中选择性富集 24h；在 M 液体培养基中选择性富集 6～8h 或 24h；与多价 H 抗血清在 50℃凝结 1h。结果可在 50h 内得到（与选择性富集时间有关），而 CCM 方法则需要 96～120h。改进的 ES 方法预富集时间为 6h，从而使检测结果可在 32h 内得到[174]。

一般 ES 方法可在 32～50h 得到结果，CCM 可在 92～120h 得到结果，ES 结果与 CCM 和 FA 结果相似，且不需要特殊的设备。它的不足在于最小检测量为 10^7 个/mL，并且不适用于非运动型沙门氏菌。若在选择性液体培养中使用多价 O 抗血清做凝结物，则可用于非运动型沙门氏菌的检测[156]。

牛皮沙门氏菌快速实验（OSRT）是 ES 改进方法。方法中使用含有两个试管的培养容器，在每一个试管底部有富集培养基，上部有选择性培养基。培养基用无菌蒸馏水溶解，然后加入一种特殊的沙门氏菌选择性培养基和新生霉素，再加入 1mL 预富集样品。在 41℃恒温培养 24h，当每一个试管中上层选择性培养基颜色发生变化时，表明有沙门氏菌存在，阳性试管还要进行牛皮沙门氏菌乳胶实验（2min）。最终使用传统生化和血清学实验得到沙门氏菌的检测结果。

11.4.3 沙门氏菌 1-2 实验

此方法与 ES 和 OSRT 方法相似。ES 方法是依靠抗体与鞭毛沙门氏菌反应进行检测的。与 ES 方法不同，1-2 实验中使用了半固态噬菌体。此方法在一个特殊的含两个容器的塑料设备中进行，一个容器中装有选择性液体培养基，另一个中装有非选择性运动性培养基。除含有选择性试剂以外，后者中还含有用于沙门氏菌的 L 丝氨酸。当选择性培养完成后，设备在恒温条件下培养，运动性沙门氏菌进入非选择性培养基中。后者中含有鞭毛抗体，当运动性沙门氏菌进入抗体区域时形成免疫带，表示抗原-抗体反应发生。经过非选择性富集可在 8～14h 内得到结果。

在对 196 种食品和饲料样品进行检测时，与培养方法相比，使用 1-2 实验方法可得到 34 个阳性结果，而使用培养方法只得到 26 个阳性结果[125]。在 1-2 实验中使用连四硫酸盐绿色发光培养基，检测 314 个样品中有 84 个为阳性，比培养方法多 3 个，且比培养方法提前一天得到结果[125]。使用此方法对含有大量沙门氏菌的 186 种食品样品进行检测时，经过预富集步骤能得到更好的结果[41]。

11.4.4 免役放射分析

此技术对抗原添加放射性标记，使被标记抗原与它的特殊抗体反应，然后用放射性测量仪检测与抗体相连的抗原的数量。固态放射性免疫测定是使单层的抗体分子与固体表面或物质相结合。所使用的固态物质有聚丙烯、聚苯乙烯和溴乙酰纤维素。被抗体包裹的聚合物可与有放射性物质标记的抗原相结合，这是固态 RIA 技术的关键。当洗去游

离的标记抗原后，进行放射性定量测量。研究中使用最多的标记物是^{125}I。

Johnson 等人[89]改进了固态 RIA 技术，将其用于金黄色葡萄球菌内毒素 B 的检测，此方法比免疫扩散技术灵敏度高 5～20 倍。研究者发现实验中使用聚苯乙烯和积分放射计数器检测，灵敏度范围为 1～5ng。Collins 等人[32]在应用 RIA 技术时使用与溴乙酰纤维素相结合的浓缩抗体检测内毒素 B，研究结果发现此方法比免疫扩散技术灵敏 100 倍，其内毒素 B 的检测准确度为 0.01μg/mL。Collins 等人从各种食品中如火腿、牛乳、羊肉等，提取出葡萄球菌内毒素 A，用 RIA 技术检测，可在 3～4h 内完成。他们发现方法的灵敏度很高，可用于 0.001μg/mL 检测，对内毒素 A 的检测准确度为 0.01μg/mL。

通过内毒素的碘化作用，固态 RIA 技术可检测 1ng 毒素/g[17]。将蛋白质 A 作为免疫吸收物用于抗原-抗体体系从没有反应毒素中分离时，对实验灵敏度＜1.0ng/g 的葡萄球菌内毒素 A（SEA）、SEB、SEC、SED、SEE，可在 1d 时间内得到结果[17,20]。另一方面，当使用蛋白质 A 的研究时，可检测到 0.1ng/mL 的 SEA 和 0.5ng/mL 的 SEB[37]；使用可溶性抗体 RIA 可使对 SEC_2 的检测灵敏度达到 100pg[152]。

RIA 技术可用于食品微生物沉淀的检测，如内毒素、贝类食品中麻醉性神中毒毒素等。使用^{125}I标记的同源抗体过滤，在微孔膜上冲洗，可在 8～10min 内对细胞进行检测和鉴定。当使用同源抗体的混合物时，在一次操作中可鉴定多细菌菌种[141]。此技术的直接方法和间接方法都可以使用，前者在混合微生物的检测中需要制备每一种微生物的标记抗体，而后者只需要准备一种标记球蛋白即可。

11.4.5 酶连免疫法（ELISA）

酶连免疫吸收剂分析方法（ELISA、酶免疫分析，EIA）是与 RIA 相似的免疫学方法，但此方法中使用酶与抗体或抗原结合而不是用放射性同位素。与此方法同义的有酶增殖免疫分析技术（EMIT）和间接酶连抗体技术（ELAT）。典型的 ELISA 方法中使用固相（聚丙烯）包埋抗原，用抗血清培养。培养后洗涤，加入酶标记的免疫抗体球蛋白。经过洗涤后，分析检测留在试管中的酶，得到在原血清中的特殊抗体数。实验中常用的酶是辣根过氧化物酶，通过添加过氧化物酶底物可检测酶的存在。利用酶底物的比色检测可确定酶的数量。基础 ELISA 的发展出现了“夹心”ELISA 技术，此技术中抗原至少需要两个结合物。抗原首先与大量的固相抗体结合，然后培养，洗涤，结合抗原再用过量的标记抗体处理。“双夹心”ELISA 是以后又发展的新技术，处理过程中使用了第三种抗体。

ELISA 技术被广泛应用于食品中微生物的检测和计数，下文中总结了一些应用。在提到的文献中有更详细的介绍。

11.4.5.1 沙门氏菌的检测

①使用具有多价鞭毛抗体 IgG 结构的多克隆 EIA 和辣根过氧化物酶，对 142 种食品样品进行分析，有 92.2%的结果与培养方法得到的结果一致。EIA 得到的假阳性结果为 6.4%、有 95.8%的结果与 FA 得到的一致[175]；

②使用微量聚丙烯平板和多克隆 EIA 并进行 MUG 分析，最低检测量为 10^7 个/mL，结果在 3d 内得到[121]；

③使用鞭毛抗原的多克隆抗体 IgA，100 个沙门氏菌中可检测到 95%，灵敏度为 10^6 个/mL，检测时间为 36h[154]；

④使用多克隆抗体 IgA 和聚碳酸酯包埋的金属熔珠，可在 2d 内完成检测，灵敏度$<10^5$ 个/mL[114]；

⑤使用 ELAT 技术和多克隆抗体，将沙门氏菌细胞加入纤维素乙酸盐滤膜，添加酶连抗体和酶底物。此方法可检测 10^4～10^5 个细胞；

⑥将两种 EIA 方法，直观方法和沙门氏菌-Tek 方法，与 DNA 探针技术，基因-Trak 技术作比较，对 294 种沙门氏菌和 100 种非沙门氏菌进行检测。沙门氏菌-Tek 技术可检测出所有的沙门氏菌，但也得到 16%的假阳性结果；直观 EIA 技术可检测 98%的沙门氏菌和 6%的非沙门氏菌；探针技术可检测 99%的沙门氏菌，但不能检测出非沙门氏菌。沙门氏菌-Tek 技术是 Bio-Enzabead 技术的发展，是第二代方法，使用了微量平板代替磁性金属熔珠[35]。阴性样品可在 48h 完成检测，这得到了 AOAC 的认定[36]；

⑦在低浓度平板抗体方法中使用了单克隆抗体，不与其他微生物发生交错反应，在 19h 内可检测 10 个细胞/25g[105]；

⑧沙门氏菌-Tek 微 ELISA 技术使用单克隆抗体，对 1～5cfu/25g 样品的检测可在 31h 内完成。最低检测量为 10^4～10^5 个细胞[185]；

⑨多克隆抗体的酶免疫抗体分析（EIMA）方法使用亚钛氢氧化物悬浮体作为固相物质。结合鞭毛抗体与抗兔碱式磷酸盐反应后，加入酶底物检测连接酶活力。此方法的灵敏度是微量平板方法的 100～160 倍。样品经过富集后，可在 8h 内得到检测结果，其最低检测量为 4000～5000 个细胞。使用 EIMA 方法对 376 种微生物检测得到 66 个阳性结果，而使用培养方法得到 65 个阳性结果[77,78]。

11.4.5.2 金黄色葡萄球菌及其内毒素的检测

①使用双抗体 EIA 技术对葡萄球菌内毒素 A（SEA）进行检测，可在 20h 内完成对维也纳香肠中 0.4ngSEA 的检测，在 1～3h 内完成对牛乳中 3.2ng/mlSEA 和蛋黄酱中 1.6ng/mL SEA 的检测[159]；

②检测中使用各自抗体包被聚丙烯球，可检测 SEA，SEB，SEC 的最少浓度为 0.1ng/mL[143]；

③使用 SEA，SEB，SEC，SEE 的标准检测方法对鲜肉进行检测，可检量$<0.5\mu g/100g$[129]；

④固相双抗体夹层方法中使用辣根过氧化物酶与特殊 IgG 内毒素抗体相连，以聚丙烯球或微量平板做固相物质。对 SEA，SEB，SEC，SED，SEE 含量$>1ng/g$ 的食品进行检测，大约需要 1d 的时间[60]；

⑤在快速夹层 ELISA 方法中使用 SEB 的多克隆抗体和生物素-抗生蛋白链菌素扩增系统，可在 1h 内完成对 0.5～1.0ng SEB 的检测[123]；

⑥将金黄色葡萄球菌菌落在纤维素硝酸盐滤膜上培养 24h 后，加入与荧光硫氰酸盐相连的辣根过氧化物酶-蛋白 A 复合物，此膜过滤 ELISA 技术的灵敏度为 500pg SEB，可在 27h 内完成检测[144]；

⑦用于金黄色葡萄球菌细胞中蛋白 A 检测的夹层 ELISA 技术使用了过氧化氢酶连

接的抗蛋白 A 抗体，可以用于金黄色葡萄球菌菌体的检测。加入过氧化氢后，在酶作用下释放出氧气，使用安培氧电极进行检测。电流的增加量与抗原（蛋白 A 或金黄色葡萄球菌细胞）浓度成正比。可检测蛋白 A 的量为 0.1ng/mL，灵敏度是传统 ELISA 方法的 20 倍。可检测金黄色葡萄球菌细胞数为 10^3～10^4/mL，而传统方法的检测量为 10^5/mL。此方法可在 18h 内完成 1cfu/g 的检测，准确度取决于金黄色葡萄球菌细胞中蛋白 A 的含量[122]；

⑧用于金黄色葡萄球菌中蛋白 A 的检测的又一种安培电极 EIA 方法得到运用，方法中使用夹层和 NAD-NADH 酶循环步骤。使用铂盘电极测量最终电势，此方法可在 4h 内完成＜100 个细胞/mL 样品的检测[2,5]。

11.4.5.3 霉菌和真菌霉素的检测

①一种标准 ELISA 方法应用于 3 种霉菌菌种（*Alternaria alternaria*，*Geotrichum candidun*，*Rhizorus stolonifer*）的检测。此方法可检测番茄酱中 1μg 干霉菌/g 样品，比化学方法灵敏度高[109]；

②使用 ELISA 方法可检测活性和非活性霉菌，比 Howard 霉菌计数方法得到的结果更好；

③用于检测黄曲霉毒素 B_1（AFB）的 ELISA 方法中，使用微菌落抗体可检测浓度为 0.1ng/mL[149]，0.2ng/mL[26]，0.5ng/mL[42]。工业用设备可检测浓度为 0.005μL/L；试管 ELISA 方法可检测浓度＜10pg/mL；聚丙烯微量平板方法可检测浓度为 25pg/mL[140]；Terasaki 平板方法可检测浓度 0.1ng/mL[139]；

④用于 AFM_1 检测的单菌落抗体技术灵敏度为 0.25ng/mL[142]；Terasaki 平板技术灵敏度为 0.05ng/mL[133]；直接 ELISA 技术灵敏度为 10～25pg/mL[75]；另一 ELISA 技术灵敏度为 0.25ng/mL[144]；

⑤一种工业用检测方法可检测 0.005μL/L 的 AFB_2 和 AFG_2；对 T-2 毒素的检测最低量为 0.05ng/mL；对棕曲霉毒素的检测最低量为 25pg/次[143]。

用于真菌毒素的其他免疫学检测方法在参考文献[142]中有详细介绍。

11.4.5.4 波特林菌毒素检测

用于毒素 A 检测的双夹层 ELISA 方法，曾实验检测 30～100 只 A 型中毒老鼠和＜100只 E 型中毒老鼠。一种双夹层 ELISA 方法中使用碱式磷酸盐和聚丙烯平板检测 G 型毒素中毒的老鼠[107]。

11.4.5.5 大肠杆菌内毒素的检测

①在使用 ELISA 技术检测内出血性肠炎大肠杆菌（EHEC）菌株时发现，用于检测此菌株的单克隆抗体具有很强的专一性[133]；

②鼠疫单克隆抗体和兔多克隆次抗体对大肠杆菌的 Stx1 和 Stx2 具有专一性，从而使双夹层 ELIAS 技术得到发展。Stx1 ELISA 可检测 200pg 的纯 Stx1 毒素，Stx2 ELISA 可检测 75pg 的纯 Stx2 毒素[45]；

③研究者对检测大肠杆菌 Stxl 内毒素的 ELISA 技术，DNA 探针技术和幼鼠分析技术进行比较，探针技术的专一性较强，但 ELISA 技术是最灵敏和最快速的[34]。

11.4.6 胶体扩散技术

胶体扩散技术广泛用于细菌毒素和内毒素的检测和定量。最常用的4种方法为单扩散试管（Oudin）方法、微斜面双扩散方法、微型Ouchterlony斜面方法和电子免疫扩散方法。它们用于检测和定量葡萄球菌和产气夹膜梭菌的内毒素、肉毒梭菌的毒素。各种方法的灵敏度在表11.1中列出。尽管它们可以使用可溶性蛋白抗体，但方法中所用的抗原要求为沉淀性。使用最为广泛的方法可能是由Casman和Bennett[27]和McClure[214]改进的Ouchterlony斜面实验方法。在图11.4中绘出了检测食品中内毒素的过程，在《细菌学分析手册》中对此有详尽介绍。微型Ouchterlony方法可检测葡萄球菌内毒素0.1～0.01μg，Oudin实验的最低检测限度与此相同。双扩散试管实验的最低检测量为0.1μg/mL，但是需要3～6d的培养时间。免疫扩散方法需要将100g样品提取浓缩为0.2mL。尽管一些方法如RIA和RPH方法比胶体扩散方法的灵敏度高且检测速度快，但胶体扩散技术仍被广泛应用。在这些方法的灵敏度范围内检测结果能保证正确性。在最近的研究中表明当斜面在45℃下培养时检测结果可在8h内得到。

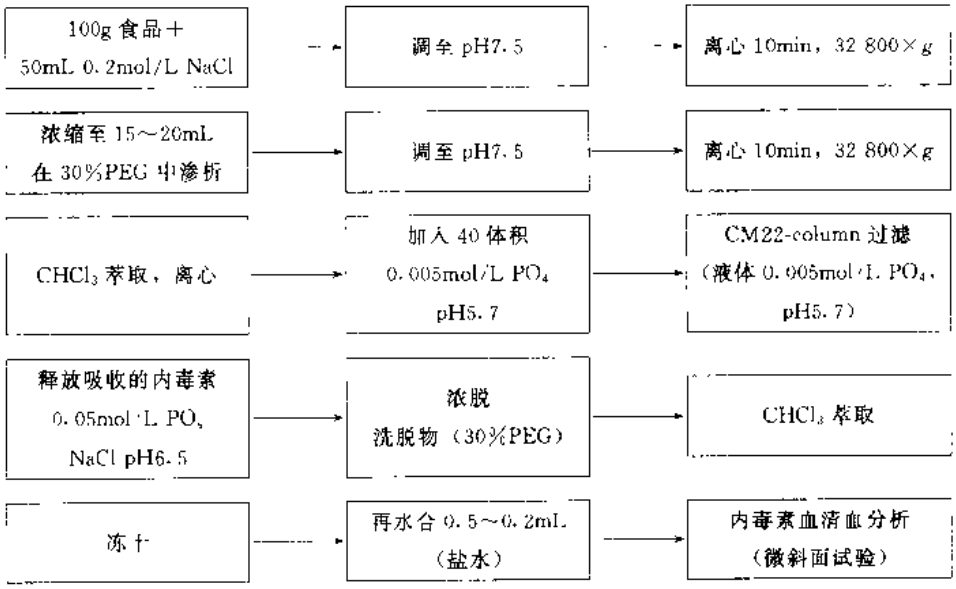


图11.4 食品中金黄色葡萄球菌内毒素的提取和血清学分析示意图

11.4.7 红血球凝聚法

抑制红血球凝聚法（HI）和逆向钝化红血球凝聚法（RPH）是两种血清学方法，检测时间为2～4h。与胶体扩散方法不同，这两种方法中的抗原不需要成沉淀性。

在HI实验中，专一抗体要保持稳定，内毒素（抗原）被稀释至微量。经恒温培养202min后，加入处理过的绵羊血红细胞（SRBCs）。只有当抗体不与抗原结合时才发生红血球凝聚（HA），当毒素的含有量达到一定程度时HA被抑制。HI对内毒素检测的灵敏度在表11.1中列出。

与HI方法相反，RPH方法中抗毒素球蛋白直接与SRBCs相连，用于检测毒素。当

加入稀释的毒素溶液后，培养2h，等待HA发生。仅当达到合适的抗原和抗体浓度时，HA才会发生。如果没有内毒素和毒素存在，HA不会发生。RPH对两种内毒素的检测水平在表11.1中列出。

参考文献

[1] Ahmed, R., P. Sankar-Mistry, S. Jackson, H. W. Ackermann, and S. S. Kasatiya. 1995. *Bacillus cereus* phage typing as an epidemiological tool in outbreaks of food poisoning. *J. Clin. Microbiol.* 33: 636～640.

[2] Areson, P. W. D., S. E. Charm, and B. L. Wong. 1980. Determination of staphylococcal enterotoxins A and B in various food extracts, using staphylococcal cells containing protein. *J. Food Sci.* 45: 400～401.

[3] Audurier, A., and C. Martin. 1989. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 251～257.

[4] Audurier, A., R. Chatelain, F. Chalons, and M. Piéchaud. 1979. Lysotypie de 823 souches de *Listeria monocytogenes* isolées en France de 1958 à 1978. *Ann. Microbiol.* (*Inst. Pasteur*) 130B: 179～189.

[5] Ayers, J. C. 1967. Use of fluorescent antibody for the rapid detection of enteric organisms in egg, poultry and meat products. *Food Technol.* 21: 631～640.

[6] Bachrach, U., and Z. Bachrach. 1974. Radiometric method for the detection of coliform organisms in water. *Appl. Microbiol.* 28: 169～171.

[7] Baez, L. A., and V. K. Juneja. 1995. Nonradioactive colony hybridization assay for detection and enumeration of enterotoxigenic *Clostridium perfringens* in raw beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 807～810.

[8] Bassler, H. A., S. J. A. Flood, K. J. Livak, J. Marmaro, R. Knorr, and C. A. Batt. 1995. Use of a fluorogenic probe in a PCR-based assay for the detection of *L. monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3724～3728.

[9] Bastish, V. K., H. Chander, and G. Ranganathan. 1984. Incidence of enterococcal thermonuclease in milk and milk products. *J. Food Sci.* 19: 1610～1611, 1615.

[10] Bautista, D. A., J. P. Vaillancourt, R. A. Clarke, S. Renwick, and M. W. Griffiths. 1995. Rapid assessment of the microbiological quality of poultry carcasses using ATP bioluminescence. *J. Food Protect.* 58: 551～554.

[11] Beezer, A. E., D. Newell, and H. J. V. Tyrrell. 1976. Application of flow microcalorimetry to analytical problems: The preparation, storage and assay of frozen inocula of *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Appl. Bacteriol.* 41: 197～207.

[12] Beezer, A. E., D. Newell, and H. J. V. Tyrrell. 1978. Characterisation and metabolic studies of *Saccharomyces cerevisiae* and *Kluyveromyces fragilis* by flow microcalorimetry. *Antonie van Leeuwenhoek* 45: 55～63.

[13] Bej, A. K., R. J. Steffan, J. DiCesare, L. Haff, and R. M. Atlas. 1990. Detection of coliform bacteria in water by polymerase chain reaction and gene probes. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 307～314.

[14] Bennett, R. W., and F. McClure. 1976. Collaborative study of the serological identification of staphylococcal enterotoxins by the microslide gel double diffusion test. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 59: 594～600.

[15] Bennett, R. W., and F. McClure. 1980. Extraction and separation of staphylococcal enterotoxin in foods: Collaborative study. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 63: 1205～1210.

[16] Berg, J. D., and L. Fiksdal. 1988. Rapid detection of total and fecal coliforms in water by enzymatic hydrolysis of 4-methylumbelliferone-β-D-galactoside. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2118～2122.

[17] Bergdoll, M. S., and R. Reiser. 1980. Application of radioimmunoassay of detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *J. Food Protect.* 43: 68～72.

[18] Bibb. W. F., B. G. Gellin, R. Weaver, B. Schwartz, B. D. Plikaytis, M. W. Reeves, R. W. Pinner, and C. V. Broome. 1990. Analysis of clinical and foodborne isolates of *Listeria monocytogenes* in the United States by multilocus enzyme electrophoresis and application of the method to epidemiologic investigations. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 2133～2141.

[19] Black, S. F., D. I. Gray, D. B. Fenton, and R. G. Kroll. 1995. Rapid RAPD analysis for distinguishing *Listeria* species and *Listeria monocytogenes* serotypes using a capillary air thermal cycler. *Lett. Appl. Microbiol.* 20: 188～189.

[20] Bottari, D. A., C. D. Emmett, C. E. Nichols, K. D. Whippie, D. Rodriguez, G. W. Durbin, K. M. Keough, E. P. Groody, M. A. Mazola, and G. N. Reynolds. 1995. Comparative study of a colorimetric DNA hybridization method and conventional culture procedures for the detection of *Listeria* spp. in foods, *J. Food Protect.* 58: 1083～1090.

[21] Brooks, J. L., B. Mirhabibollahi, and R. G. Kroll. 1990. Sensitive enzyme-amplified electrical immunoassay for protein A-bearing *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3278～3284.

[22] Bulte, M., and G. Reuter. 1984. Impedance measurement as a rapid method for the determination of the microbial contamination of meat surfaces, testing two different instruments. *Int. J. Food Microbiol.* 1: 113～125.

[23] Brosch, R., H. Chen, and J. B. Luchansky. 1994. Pulsed-field fingerprinting of listeriae: Identification of genomic divisions for *Listeria monocytogenes* and their correlation with serovar. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 2584～2592.

[24] Brosch, R., C. Buchrieser, and J. Rocourt. 1991. Subtyping of *Listeria monocytogenes* serovar 4b by use of low-frequency-cleavage restriction endonucleases and pulsed-field gel electrophoresis. *Res. Microbiol.* 142: 667～675.

[25] Cady. P., D. Hardy, S. Martins, S. W. Dufour, and S. J. Kraeger. 1978. Automated impedance measurements for rapid screening of milk microbial content. *J. Food Protect.* 41: 277～283.

[26] Candlish, A. A. G., W. H. Stimson, and J. E. Smith. 1985. A monoclonal antibody to aflatoxin B_1: Detection of the mycotoxin by enzyme immunoassay. *Lett. Appl. Microbiol.* 1: 57～61.

[27] Casman, E. P., and R. W. Bennett. 1965. Detection of staphylococcal enterotoxin in food. *Appl, Microbiol.* 13: 181～189.

[28] Cernic, G. 1976. Method for the distinction of gram-negative from gram-positive bacteria. *Eur. J. Appl. Microbiol.* 3: 223～225.

[29] Cherry, W. B., and M. D. Moody. 1965. Fluorescent-antibody techniques in diagnostic bacteriol. *Bacteriol. Rev.* 29: 222～250.

[30] Chesbro, W. R., and K. Auborn. 1967. Enzymatic detection of the growth of *Staphylococcus aureus* in foods. *Appl. Microbiol.* 15: 1150~1159.

[31] Collins, W. S., II, A. D. Johnson, J. F. Metzger, and R. W. Bennett. 1973. Rapid solid-phase radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Microbiol.* 25: 774~777.

[32] Collins, W. S., II, J. F. Metzger, and A. D. Johnson. 1972. A rapid solid phase radioimmunoassay for staphylococcal B enterotoxin. *J. Immunol.* 108: 852~856.

[33] Cousin, M. A., J. M. Jay, and P. C. Vasavada. 1992. Psychrotrophic microorganisms. In *Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods*, ed. C. Vanderzant and D. F. Splittstoesser, 153~168. Washington, DC: American Public Health Association.

[34] Cryan, B. 1990. Comparison of three assay systems for detection of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin. *J. Clin. Microbiol.* 28: 792~794.

[35] Curiale, M. S., D. McIver, S. Weathersby, and C. Planer. 1990. Detection of salmonellae and other Enterobacteriaceae by commercial deoxyribonucleic acid hybridization and enzyme immunoassay kits. *J. Food Protect.* 53: 1037~1046.

[36] Curiale, M. S., M. J. Klatt, B. J. Robison, and L. T. Beck. 1990. Comparison of colorimetric monoclonal enzyme immunoassay screening methods for detection of *Salmonella* in foods. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 43~50.

[37] D'Aoust, J. -Y., and A. M. Sewell. 1988. Reliability of the immunodiffusion 1-2 Test™ system for detection of *Salmonella* in foods. *J. Food Protect.* 51: 853~856.

[38] D'Aoust, J. -Y., A. M. Sewell, P. Greco, M. A. Mozola, and R. E. Colvin. 1995. Performance assessment of the GENE-TRAK® colorimetric probe assay for the detection of foodborne *Salmonella* spp. *J. Food Protect.* 58: 1069~1076.

[39] Czajka, J., N. Bsat, M. Piani, W. Russ, K. Sultana, M. Wiedmann, R. Whitaker, and C. A. Batt. 1993. Differentiation of *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* by 16S rRNA genes and intraspecies discrimination of *Listeria monocytogenes* strains by random amplified polymorphic DNA polymorphisms. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 304~308.

[40] Dean, P. N., and D. Pinkel. 1978. High resolution dual laser flow cytometry. *J. Histochem. Cytochem.* 26: 622~627.

[41] de Castro, B. P., M. A. Asenio, B. Sanz, and J. A. Ordonez. 1988. A method to assess the bacterial content of refrigerated meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1462~1465.

[42] Dixon-Holland, D. E., J. J. Pestka, B. A. Bidigare, W. L. Casale, R. L. Warner, B. P. Ram, and L. R. Hart. 1988. Production of sensitive monoclonal antibodies to aflatoxin B_1 and aflatoxin M_1 and their application to ELISA of naturally contaminated foods. *J. Food Protect.* 51: 201~204.

[43] Dodds, K. L., R. A. Holley, and A. G. Kempton. 1983. Evaluation of the catalase and *Limulus* amoebocyte lysate tests for rapid determination of the microbial quality of vacuum-packed cooked turkey. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 16: 167~172.

[44] Dovey, S., and K. J. Towner. 1989. A biotinylated DNA probe to detect bacterial cells in artificially contaminated foodstuffs. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 43~47.

[45] Downes, F. P., J. H. Green, K. Greene, N. Stockbine, J. G. Wells, and I. K. Wachsmuth. 1989. Development and evaluation of enzyme-linked immunosorbent assays for detection of Shiga-like toxin I and Shiga-like toxin II. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1292~1297.

[46] Edberg, S. C., M. J. Allen, and D. B. Smith, and the National Collaborative Study. 1989. National field evaluation of a defined substrate method for the simultaneous detection of total coliforms and *Escherichia coli* from drinking water: Comparison with presence-absence techniques. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1003～1008.

[47] Erickson, A., and R. H. Deibel. 1973. Turbidimetric assay of staphylococcal nuclease. *Appl. Microbiol.* 25: 337～341.

[48] Ericsson, H., P. Stalhandske, M. -L. Danielsson-Tham, E. Bannerman, J. Bille, C. Jacquet, J. Rocourt, and W. Tham. 1995. Division of *Listeria monocytogenes* serovar 4b strains into two groups by PCR and restriction enzyme analysis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3872～3874.

[49] Evans, H. A. V. 1982. A note on two uses for impedimetry in brewing microbiology. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 423～426.

[50] Fallowfield, H. J., and J. T. Patterson. 1985. Potential value of the *Limulus* lysate assay for the measurement of meat spoilage. *J. Food Technol.* 20: 467～479.

[51] Farber, J. M., and C. J. Addison. 1994. RAPD typing for distinguishing species and strains in the genus *Listeria*. *J. Appl. Bacteriol.* 77: 242～250.

[52] Feng, P. C. S., and P. A. Hartman. 1982. Fluorogenic assays for immediate confirmation of *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1320～1329.

[53] Fiedler, F., J. Seger, A. Schrettenbrunner, and H. P. R. Seeliger, 1984. The biochemistry of murein and cell wall teichoic acids in the genus *Listeria*. *System. Appl. Microbiol.* 5: 360～376.

[54] Firstenberg-Eden, R. 1983. Rapid estimation of the number of microorganisms in raw meat by impedance measurement. *Food Technol.* 37 (1): 64～70.

[55] Firstenberg-Eden, R. 1984. Collaborative study of the impedance method for examining raw milk samples. *J. Food Protect.* 47: 707～712.

[56] Firstenberg-Eden, R., and C. S. Klein. 1983. Evaluation of a rapid impedimetric procedure for the quantitative estimation of coliforms. *J. Food Sci.* 48: 1307～1311.

[57] Firstenberg-Eden, R., M. L. Van Sise, J. Zindulis, and P. Kahn. 1984. Impedimetric estimation of coliforms in dairy products. *J. Food Sci.* 49: 1449～1452.

[58] Forrest, W. W. 1972. Microcalorimetry. *Meth. Microbiol.* 6B: 285～318.

[59] Frampton, E. W., L. Restaino, and N. Blaszko. 1988. Evaluation of the B-glucuronidase substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-D-glucuronide (X-GLUC) in a 24h direct plating method for *Escherichia coli*. *J. Food Protect.* 51: 402～404.

[60] Freed, R. C., M. L. Evenson, R. F. Reiser, and M. S. Bergdoll. 1982. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxins in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1349～1355.

[61] Fujita, T., P. R. Monk, and I. Wadso. 1978. Calorimetric identification of several strains of lactic acid bacteria. *J. Dairy Res.* 45: 457～463.

[62] George, C. G., and W. E. Kloos. 1994. Comparison of the *Sma*I digested chromosomes of *Staphylococcus epidermidis* and the closely related species *Staphylococcus capitis* and *Staphylococcus caprae*. *Int. J. System. Bacteriol.* 44: 404～409.

[63] Gnan, S., and L. O. Luedecke. 1982. Impedance measurements in raw milk as an alternative to the standard plate count. *J. Food Protect.* 45: 1～7.

[64] Goepfert, J. M., and N. F. Insalata. 1969. Salmonellae and the fluorescent antibody technique:

A current evaluation. *J. Milk Food Technol.* 32: 465～473.

[65] Gram, L., and H. Sogaard. 1985. Microcalorimetry as a rapid method for estimation of bacterial levels in ground meat. *J. Food Protect.* 48: 341～345.

[66] Grunstein, M., and D. S. Hogness. 1975. Colony hybridization: A method for the isolation of cloned DNAs that contain a specific gene. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 72: 3961～3965.

[67] Hall, R. H., F. M. Khambaty, M. H. Kothary, S. P. Keasler, and B. D. Tall. 1991. *Vibrio cholerae* non 01 serogroup associated with cholera gravis genetically and physiologically resembles 01 El Tor cholera strains. *Infect. Immun.* 62: 3859～3863.

[68] Hardy, D., S. W. Dufour, and S. J. Kraeger. 1975. Rapid detection of frozen food bacteria by automated impedance measurements. *Proceedings, Institute of Food Technologists.*

[69] Harvey, J., and A. Gilmour. 1994. Application of multilocus enzyme electrophoresis and restriction fragment length polymorphism analysis to the typing of *Listeria monocytogenes* strains isolated from raw milk, nondairy foods, and clinical and veterinary sources. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1547～1553.

[70] Hatcher, W. S., S. DiBenedetto, L. E. Taylor, and D. L. Murdock. 1977. Radiometric analysis of frozen concentrated orange juice for total viable microorganisms. *J. Food Sci.* 42: 636～639.

[71] Hill, W. E., J. M. Madden, B. A. McCardell, D. B. Shah, J. A. Jagow, W. L. Payne, and B. K. Boutin. 1983. Foodborne enterotoxigenic *Escherichia coli*. Detection and enumeration by DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1324～1330.

[72] Hill, W. E., S. P. Keasler, M. W. Trucksess, P. Feng, C. A. Kaysner, and K. A. Lampel. 1991. Polymerase chain reaction identification of *Vibrio vulnificus* in artificially contaminated oysters. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 707～717.

[73] Hill, W. E., W. L. Payne, G. Zon, and S. L. Moseley. 1985. Synthetic oligodeoxyribonucleotide probes for detecting heat-stable enterotoxin-producing *Escherichia coli* by DNA colony hybridization. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 1187～1191.

[74] Horan, P. K., and L. L. Wheeless, Jr. 1977. Quantitative single cell analysis and sorting. *Science* 198: 149～157.

[75] Hu, W. J., N. Woychik, and F. S. Chu. 1984. ELISA of picogram quantities of aflatoxin M_1 in urine and milk. *J. Food Protect.* 47: 126～127.

[76] Hutter, K. -J., M. Stöhr, and H. E. Eipel. 1980. Simultaneous DNA and protein measurements of microorganisms. In *Flow Cytometry*, eds. O. D. Laerum, T. Lindmo and E. Thorud. vol. 1, 100～102. Bergen: Universitetsforlaget.

[77] Ibrahim, G. F., and M. J. Lyons, 1987. Detection of salmonellae in foods with an enzyme immunometric assay. *J. Food Protect.* 50: 59～61.

[78] Ibrahim, G. F., M. J. Lyons, R. A. Walker, and G. H. Fleet. 1985. Rapid detection of salmonellae by immunoassays with titanous hydroxide as the solid phase. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 670～675.

[79] Izat, A. L., C. D. Driggers, M. Colberg, M. A. Reiber, and M. H. Adams. 1989. Comparison of the DNA probe to culture methods for the detection of *Salmonella* on poultry carcasses and processing waters. *J. Food Protect.* 52: 564～570.

[80] Jacquet, C., B. Catimel, R. Brosch, C. Buchrieser, P. Dehaumont, V. Goulet, A. Lepoutre, P. Veit, and J. Rocourt. 1995. Investigations related to the epidemic strain involved in the French

listeriosis outbreak in 1992. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2242～2246.

[81] Jaksch, V. P., K. -J. Zaadhof, and G. Terplan. 1982. Zur Bewertung der hygienischen Qualitat von Milchprodukten mit dem *Limulus* Test. *Molkerei-Zeitung Welt der Milch* 36: 5～8.

[82] Jay, J. M. 1974. Use of the *Limulus* lysate endotoxin test to assess the microbial quality of ground beef. *Bacteriol. Proc.* 13.

[83] Jay, J. M. 1977. The *Limulus* lysate endotoxin assay as a test of microbial quality of ground beef. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 99～109.

[84] Jay, J. M. 1981. Rapid estimation of microbial numbers in fresh ground beef by use of the *Limulus* test. *J. Food Protect.* 44: 275～278.

[85] Jay, J. M., and S. Margitic. 1979. Comparison of homogenizing, shaking, and blending on the recovery of microorganisms and endotoxins from fresh and frozen ground beef as assessed by plate counts and the *Limulus* amoebocyte lysate test. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 879～884.

[86] Jay, J. M., S. Margitic, A. L. Shereda, and H. V. Covington. 1979. Determining endotoxin content of ground beef by the *Limulus* amoebocyte lysate test as a rapid indicator of microbial quality. *Appl. Environ. Microbiol.* 38: 385～890.

[87] Jay, J. M. 1989. The *Limulus* amoebocyte lysate (LAL) test. In *Progress in Industrial Microbiology: Rapid Methods in Food Microbiology*, ed. M. R. Adams and C. F. A. Hope, 101～119. Amsterdam: Elsevier.

[88] Johnson, D. W., N. J. Pieniazek, D. W. Griffin, L. Misener, and J. B. Rose. 1995. Development of a PCR protocol for sensitive detection of *Crytosporidium* oocysts in water samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3849～3856.

[89] Johnson, H. M., J. A. Bukovic, P. E. Kauffman, and J. T. Peeler. 1971. Staphylococcal enterotoxin B: Solid-phase radioimmounosassay. *Appl. Microbiol.* 22: 837～841.

[90] Johnson, J. A., C. A. Salles, P. Panigrahi, M. J. Albert, A. C. Wright, R. J. Johnson, and J. G. Morris, Jr, 1994. *Vibrio cholerae* 0139 synonym Bengal is closely related to *Vibrio cholerae* El Tor but has important differences. *Infect. Immun.* 62: 2108～2110.

[91] Johnson, J. M., S. D. Weagant, K. C. Jinneman, and J. L. Bryant. 1995. Use of pulsed-field gel electrophoresis for epidemiological study of *Escherichia coli* 0157: H7 during a food-borne outbreak. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2806～2808.

[92] Karl, D. M. 1980. Cellular nucleotide measurements and applications in microbial ecology. *Microbiol. Rec.* 14: 739～796.

[93] Kauffmann, F. 1944. Zur Serologie der Coli-Gruppe. *Acta Path. Microbiol. Scand.* 21: 20～45.

[94] Kaysner, C. A., S. D. Weagant, and W. E. Hill. 1988. Modification of the DNA colony hybridization technique for multiple filter analysis. *Molec. Cell. Probes* 2: 255～260.

[95] Kennedy, J. E., Jr., and J. L. Oblinger, 1985. Application of bioluminescence to rapid determination of microbial levels in ground beef. *J. Food Protect.* 48: 334～340.

[96] Kleppe, K., E. Ohtsuka, R. Kleppe, I. Molineux, and H. G. Khorana. 1971. Studies on polynucleotides. XCVI. Rapid replication of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J. Mol. Biol.* 56: 341～361.

[97] Koburger, J. A., and M. L. Miller. 1985. Evaluation of a fluorogenic MPN procedure for determining *Escherichia coli* in oysters. *J. Food Protect.* 48: 244～245.

[98] Kodikara, C. P., H. H. Crew, and G. S. A. B. Stewart. 1991. Near on-line detection of enteric bacteria using *lux* recombinant bacteriophage. *FEMS Microbiol. Lett.* 82: 261～266.

[99] Koupal, A., and R. H. Deibel. 1978. Rapid qualitative method for detecting staphylococcal nuclease in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 1193～1197.

[100] Krysinski, E. P., and R. C. Heimsch. 1977. Use of enzyme-labeled antibodies to detect *Salmonella* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 947～954.

[101] Lachica, R. V., K. F. Weiss, and R. H. Deibel. 1969. Relationships among coagulase, enterotoxin, and heat-stable deoxyribonuclease production by *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 18: 126～127.

[102] Lampi, R. A., D. A. Mikelson, D. B. Rowley, J. J. Previte, and R. E. Wells, 1974. Radiometry and microcalorimetry—techniques for the rapid detection of foodborne microorganisms. *Food Technol.* 28 (10): 52～55.

[103] Lawrence, L. M., and A. Gilmour, 1995. Characterization of *Listeria monocytogenes* isolated from poultry products and from the poultry-processing environment by random amplification of polymorphic DNA and multilocus enzyme electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 2139～2144.

[104] Lawrence, L. M., J. Harvey, and A. Gilmour. 1993. Development of a random amplification of polymorphic DNA typing method for *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3117～3119.

[105] Lee, H. A., G. M. Wyatt, S. Bramham, and M. R. A. Morgan. 1990. Enzyme-linked immunosorbent assay for *Salmonella typhimurium* in food: Feasibility of 1-day *Salmonella* detection. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1541～1546.

[106] Levin, G. V., V. R. Harrison, and W. C. Hess. 1956. Preliminary report on a one-hour presumptive test for coliform organisms. *J. Amer. Water Works Assoc.* 18: 75～80.

[107] Lewis, G. E., Jr., S. S. Kulinski, D. W. Reichard, and J. F. Metzger. 1981. Detection of *Clostridium botulinum* Type G toxin by enzyme linked immunosorbent assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 12: 1018～1022.

[108] Lin, H. H., and M. A. Cousin. 1987. Evaluation of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of molds in food. *J. Food Sci.* 52: 1089～1094, 1096.

[109] Lin, H. H., R. M. Lister, and M. A. Cousin. 1986. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of mold in tomato puree. *J. Food Sci.* 51: 180～183, 192.

[110] Littel, K. J., and P. A. Hartman. 1983. Fluorogenic selective and differential medium for isolation of fecal streptococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 622～627.

[111] Loessner, M. J. 1991. Improved procedure for bacteriophage typing of *Listeria* strains and evaluation of new phages. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 882～884.

[112] Loessner, M. J. and M. Busse. 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1912～1918.

[113] Martins, S. B., and M. J. Selby. 1980. Evaluation of a rapid method for the quantiative estimation of coliforms in meat by impedimetric procedures. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 518～524.

[114] Mattingly, J. A., and W. D. Gehle. 1984. An improved enzyme immunoassay for the detection of *Salmonella*. *J. Food Sci.* 49: 807～809.

[115] Mazurier, S. I., A. Audurier, N. Marquet-Van der Mee, S. Notermans, and K. Wernars.

1992. A comparative study of randomly amplified polymorphic DNA analysis and conventional phage typing for epidemiological studies of *Listeria monocytogenes* isolates. *Res. Microbiol.* 143: 507～512.

[116] McClelland, R. G., and A. C. Pinder. 1994. Detection of *Salmonella typhimurium* in dairy products with flow cytometry and monoclonal antibodies. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4255～4262.

[117] McLauchlin, J., A. Audurier, and A. G. Taylor. 1986. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967～1984; The use of serotyping and phage typing. *J. Med. Microbiol.* 22: 367～377.

[118] Meighen, E. A. 1988. Enzymes and genes from the *lux* operons of bioluminescent bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 42: 151～176.

[119] Mendelsohn, M. L. 1980. The attributes and applications of flow cytometry. In *Flow Cytometry*, ed. O. D. Laerum, T. Lindmo, and E. Thorud, vol. 4, 15～27. Bergen: Universitetsforlaget.

[120] Miller, B. A., R. F. Reiser, and M. S. Bergdoll. 1978. Detection of staphylococcal enterotoxins A, B, C, D, and E in foods by radioimmunoassay, using staphylococcal cells containing protein A as immunoadsorbent. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 421～426.

[121] Minnich, S. A., P. A. Hartman, and R. C. Heimsch. 1982. Enzyme immunoassay for detection of salmonellae in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 877～883.

[122] Mirhabibollahi, B., J. L. Brooks, and R. G. Kroll. 1990. Development and performance of an enzyme-linked amperometric immunosensor for the detection of *Staphylococcus aureus* in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 68: 577～585.

[123] Morissette, C., J. Goulet, and G. Lamoureux. 1991. Rapid and sensitive sandwich enzymelinked immunosorbent assay for detection of staphylococcal enterotoxin B in cheese. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 836～842.

[124] Nakamura, T., T. Morita, and S. Iwanga. 1986. Lipopolysaccharide-sensitive serine-protease zymogen (factor C) found in *Limulus* hemocytes. Isolation and characterization. *Eur. J. Biochem.* 154: 511～521.

[125] Nath, E. J., E. Neidert, and C. J. Randall. 1989. Evaluation of enrichment protocols for the 1～2 Test™ for *Salmonella* detection in naturally contaminated foods and feeds. *J. Food Protect.* 52: 498～499.

[126] Niskanen, A., and L. Koiranen, 1977. Correlation of enterotoxin and thermonuclease production with some physiological and biochemical properties of staphylococcal strains isolated from different sources. *J. Food Protect.* 40: 543～548.

[127] Niskanen, A., and E. Nurmi. 1976. Effect of starter culture on staphylococcal enterotoxin and thermonuclease production in dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 11～20.

[128] Norrung, B., and N. Skovgaard. 1993. Application of multilocus enzyme electrophoresis in studies of the epidemiology of *Listeria monocytogenes* in Denmark. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2817～2822.

[129] Notermans, S., J. Dufrenne, and M. van Schothorst. 1978. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of *Clostridium botulinum* toxin type A. *Japan. J. Med. Sci. Biol.* 31: 81～85.

[130] Notermans, S., K. J. Heuvelman, and K. Wernars. 1988. Synthetic enterotoxin B DNA probes for detection of enterotoxigenic *Staphylococcus aureus* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 531～533.

[131] Nuzback, D. E., E. E. Bartley, S. M. Dennis, T. G. Nagaraja, S. J. Galitzer, and A. D. Dayton. 1983. Relation of rumen ATP concentration to bacterial and protozoal numbers, *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 533～538.

[132] Ortel. S. 1989. Listeriocins (monocins). *Int J. Food Microbiol.* 8: 249～250.

[133] Padhye, N. V., and M. P. Doyle. 1991. Production and characterization of a monoclonal antibody specific for enterohemorrhagic *Escherichia coli* of serotypes 0157: H7 and 026: H11. *J. Clin. Microbiol.* 29: 99～103.

[134] Park, C. E., H. B. El Derea, and M. K. Rayman, 1978. Evaluation of staphylococcal thermonuclease (TNase) assay as a means of screening foods for growth of staphylococci and possible enterotoxin production. *Can. J. Microbiol.* 24: 1135～1139.

[135] Paton, A. W., J. C. Paton, P. N. Goldwater, and P. A. Manning. 1993. Direct detection of *Escherichia coli* Shiga-like toxin genes in primary fecal cultures by polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31: 3063～3067.

[136] Patterson, J. W., P. L. Brezonik, and H. D. Putnam. 1970. Measurement and significance of adenosine triphosphate in activated sludge. *Environ. Sci. Technol.* 4: 569～575.

[137] Perry, B. F., A. E. Beezer, and R. J. Miles. 1979. Flow microcalorimetric studies of yeast growth: Fundamental aspects. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 527～537.

[138] Perry, B. F., A. E. Beezer, and R. J. Miles. 1983. Characterization of commercial yeast strains by flow microcalorimetry. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 183～189.

[139] Pestka, J. J., and F. S. Chu. 1984. Enzyme-linked immunosorbent assay of mycotoxins using nylon bead and Terasaki plate solid phases. *J. Food Protect.* 47: 305～308.

[140] Pestka, J. J., P. K. Gaur, and F. S. Chu. 1980. Quantitation of aflatoxin B_1 and aflatoxin B_1 antibody by and enzyme-linked immunosorbent microassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1027～1031.

[141] Pestka, J. J., V. Li. W. O. Harder, and F. S. Chu. 1981. Comparison of radioimmunoassay and enzyme-linked immunosorbent assay for determining aflatoxin M_1 in milk. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 64: 294～301.

[142] Pestka, J. J., M. N. Abouzied, and Sutikno (sic). 1995. Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technol.* 49 (2): 120～128.

[143] Pestka, J. J., B. W. Steinert, and F. S. Chu. 1981. Enzyme-linked immunosorbent assay for detection of ochratoxin A. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1472～1474.

[144] Peterkin, P. I., and A. N. Sharpe. 1984. Rapid enumeration of *Staphylococcus aureus* in foods by direct demonstration of enterotoxigenic colonies on membrane filters by enzyme immunoassay. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1047～1053.

[145] Peterson, E. H., M. L. Nierman, R. A. Rude, and J. T. Peeler. 1987. Comparison of AOAC method and fluorogenic (MUG) assay for enumerating *Escherichia coli* in foods. *J. Food Sci.* 52: 409～410.

[146] Piffaretti, J. -C., H. Kressebuch, M. Aeschbacher, J. Bille, E. Bannerman, J. M. Musser, R. K. Selander, and J. Rocourt. 1989. Genetic characterization of clones of the bacterium *Listeria monocytogenes* causing epidemic disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86: 3818～3822.

[147] Poelma, P. L., C. R. Wilson, and W. H. Andrews. 1987. Rapid fluorogenic enumeration of *Escherichia coli* in selected, naturally contaminated high moisture foods. *J. Assoc. Off. Anal.*

Chem. 70: 991～993.

[148] Previte, J. J. 1972. Radiometric detection of some food-borne bacteria. *Appl. Microbiol.* 24: 535～539.

[149] Ramakrishna, N., J. Lacey, A. A. G. Candish, J. E. Smith, and I. A. Goodbrand. 1990. Monoclonal antibody-based enzyme linked immunosorbent assay of aflatoxin B_1, T-2 toxin, and ochratoxin A in barley. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 71～76.

[150] Rippey, S. R., L. A. Chandler, and W. D. Watkins. 1987. Fluorometric method for enumeration of *Escherichia coli* in molluscan shellfish. *J. Food Protect.* 50: 685～690.

[151] Restaino, L., E. W. Frampton, and R. H. Lyon. 1990. Use of the chromogenic substrate 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-β-glucuronide (X-GLUC) for enumerating *Escherichia coli* in 24h from ground beef. *J. Food Protect.* 53: 508～510.

[152] Robern, H., M. Dighton, Y. Yano, and N. Dickie. 1975. Double-antibody radioimmunoassay for staphylococcal enterotoxin C_2. *Appl. Microbiol.* 30: 525～529.

[153] Robison, B. J. 1984. Evaluation of a fluorogenic assay for detection of *Escherichia coli* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 285～288.

[154] Robison, B. J., C. I. Pretzman, and J. A. Mattingly. 1983. Enzyme immunoassay in which a myeloma protein is used for detection of salmonellae. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 1816～1821.

[155] Rocourt, J., A. Audurier, A. L. Courtieu, J. Durst, S. Ortel, A. Schrettenbrunner, and A. G. Taylor. 1985. A multi-centre study on the phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Zbl. Bakt. Hyg. A* 259: 489～497.

[156] Rowley, D. B., J. J. Previte, and H. P. Srinivasa. 1978. A radiometric method for rapid screening of cooked foods for microbial acceptability. *J. Food Sci.* 43: 1720～1722.

[157] Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich. 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487～491.

[158] Samadpour, M., J. Liston, J. E. Ongerth, and P. I. Tarr. 1990. Evaluation of DNA probes for detection of Shiga-like-toxin-producing *Escherichia coli* in food and calf fecal samples. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1212～1215.

[159] Saunders, G. C., and M. L. Bartlett. 1977. Double-antibody solid-phase enzyme immunoassay for the detection of staphylococcal enterotoxin A. *Appl. Environ, Microbiol.* 34: 518～522.

[160] Selander, R. K., D. A. Caugant, H. Ochman, J. M. Musser, M. N. Gilmour, and T. S. Whittam. 1986. Methods of multilocus enzyme electrophoresis for bacterial population genetics and systematics. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 873～884.

[161] Seifert, H., and P. Gerner-Smidt. 1995. Comparison of ribotyping and pulsed-field gel electrophoresis for molecular typing of *Acinetobacter* isolates. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1402～1407.

[162] Seiter, J. A., and J. M. Jay. 1980. Comparison of direct serial dilution and most-probablenumber methods for determining endotoxins in meats by the *Limulus* amoebocyte lysatetest. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 177～178.

[163] Sharpe, A. N., M. N. Woodrow, and A. K. Jackson. 1970. Adenosine-triphosphate (ATP) levels in foods contaminated by bacteria. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 758～767.

[164] Shelef, L. A., and G. Eden. 1996. Optical instrument rapidly detects and enumerates microorgan-

isms in food. *Food Technol.* 50 (1): 82～85.

[165] Siragusa, G. R., and C. N. Cutter. 1995. Microbial ATP bioluminescence as a means to detect contamination on artifically contaminated beef carcass tissue. *J. Food Protect.* 58: 764～769.

[166] Sperber, W. H., and R. H. Deibel. 1969. Accelerated procedure for *Salmonella* detection in dried foods and feeds involving only broth cultures and serological reactions *Appl. Microbiol.* 17: 533～539.

[167] Stannard, C. J., and J. M. Wood. 1983. The rapid estimation of microbial contamination of raw meat by measurement of adenosine triphosphate (ATP). *J. Appl. Bacteriol.* 55: 429～438.

[168] Stewart, G. S. A. B., and P. Williams. 1992. *Lux* genes and the applications of bacterial bioluminescence. *J. Gen. Microbiol.* 138: 1289～1300.

[169] Stiffler-Rosenberg, G., and H. Fey. 1978. Simple assay for staphylococcal entertotoxins A, B, and D: Modification of enzyme-linked immunosorbent assay. *J. Clin. Microbiol.* 8: 473～479.

[170] Stoflet, E. S., D. D. Koeberi, G. Sarkar, and S. S. Sommer. 1988. Genomic amplification with transcript sequencing. *Science* 239: 491～494.

[171] Strange, R. E., and K. L. Martin. 1972. Rapid assays for the detection and determination of sparse populations of bacteria and bacteriophage T7 with radioactively labelled homologous antibodies. *J. Gen. Microbiol.* 72: 127～141.

[172] Strange, R. E., E. O. Powell, and T. W. Pearce. 1971. The rapid detection and determination of sparse bacterial populations with radioactively labelled homologous antibodies. *J. Gen Microbiol.* 67: 349～357.

[173] Sullivan, J. D., Jr., P. C. Ellis, R. G. Lee, W. S. Combs, Jr., and S. W. Watson. 1983. Comparison of the *Limulus* amoebocyte lysate test with plate counts and chemical analyses for assessment of the quality of lean fish. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 720～722.

[174] Surdy, T. E., and S. G. Haas. 1981. Modified enrichment-serology procedure for detection of salmonellae in soy products. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 704～707.

[175] Swaminathan, B., and J. C. Ayres. 1980. A direct immunoenzyme method for the detection of salmonellae in foods. *J. Food Sci.* 45: 352～355, 361.

[176] Swaminathan, B., and P. Feng. 1994. Rapid detection of food-borne pathogenic bacteria. *Ann. Rev. Microbiol.* 48: 401～426.

[177] Sword, C. P., and M. J. Pickett. 1961. The isolation and characterization of bacteriophages from *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 25: 241～248.

[178] Tai, J. Y., R. C. Seid, Jr., R. D. Hurn, and T. Y. Liu. 1977. Studies on *Limulus* amoebocyte lysate. II. Purification of the coagulogen and the mechanism of clotting. *J. Biol. Chem.* 252: 4773～4776.

[179] Terplan, V. G., K. J. Zaadhof, and S. Buchholz-Berchtold. 1975. Zum nachweis von Endotoxinen gramnegativer Keime in Milch mit dem *Limulus*-test. *Arch. Lebensmittelhyg.* 26: 217～221.

[180] Thompson, J. S., D. S. Hodge, and A. A. Borczyk. 1990. Rapid biochemical test to identify verocytotoxin-positive strains of *Escherichia coli* serotype 0157. *J. Clin. Microbiol.* 28: 2165～2168.

[181] Thore, A., S. Anséhn, A. Lundin, and S. Bergman. 1975. Detection of bacteriuria by luciferase assay of adenosine triphosphate. *J. Clin. Microbiol.* 1: 1～8.

[182] Tsuji, K., P. A. Martin, and D. M. Bussey. 1984. Automation of chromogenic substrate *Limulus*

amebocyte lysate assay method for endotoxin by robotic system. *Appl. Environ. Microbiol.* 48: 550～555.

[183] Turpin, P. E., K. A. Maycroft, J. Bedford, C. L. Rowlands. and E. M. H. Wellington. 1993. A rapid luminescent-phage based MPN method for the enumeration of *Salmonella typhimurium* in environmental samples. *Lett. Appl. Microbiol.* 16: 24～27.

[184] Ulitzur, S., and J. Kuhn. 1987. Introduction of *lux* genes into bacteria, a new approach for specific determination of bacteria and their antibiotic susceptibility. In *Bioluminescence and Chemiluminescence: New Perspectives*, eds. J. Schlomerich, R. Andreesen, A. Knapp, M. Ernst, and W. G. Woods, 463～472. Nwe York: Wiley.

[185] Van Wart, M., and L. J. Moberg. 1984. Evaluation of a novel fluorogenic-based method for detection of *Escherichia coli*. *Bacteriol. Proc.* 201.

[186] Wachtel, R. E., and K. Tsuji. 1977. Comparison of *Limulus* amebocyte lysates and correlation with the United States Pharmacopeial pyrogen test. *Appl. Environ. Microbiol.* 33: 1265～1269.

[187] Warren, L. S. R. E. Benoit, and J. A. Jessee. 1978. Rapid enumeration of fecal coliforms in water by a colorimetric β-galactosidase assay. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 136～141.

[188] Watkins, W. D., S. R. Rippey, C. S. Clavet, D. J. Kelley-Reitz, and W. Burkhardt III. 1988. Novel compound for identifying *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1874～1875.

189] Weihe, J. L., S. L. Seist, and W. S. Hatcher, Jr. 1984. Estimation of microbial populations in frozen concentrated orange juice using automated impedance measurements. *J. Food Sci.* 49: 243～245.

[190] Wernars, K., C. J. Heuvelman, T. Chakraborty, and S. H. W. Notermans. 1991. Use of the polymerase chain reaction for direct detection of *Listeria monocytogences* in soft cheese. *J. Appl. Bacteriol.* 70: 121～126.

[191] Wesley, I. V., and F. Ashton. 1991. Restriction enzyme analysis of *Listeria monocytogenes* strains associated with food-borne epidemics. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 969～975.

[192] Wesley, I. V., R. D. Wesley, J. Heisick, F. Harrel, and D. Wagner. 1990. Restriction enzyme analysis in the epidemiology of *Listeria monocytogenes*. In *Symposium on Cellular and Molecular Modes of Action of Selected Microbial Toxins in Foods and Feeds*. ed. J. L. Richard, 225～238. New York: Plenum.

[193] Wolcott, M. J. 1991. DNA-based rapid methods for the detection of foodborne pathogens. *J. Food Protect.* 54: 387～401.

[194] Wood, J. M., V. Lach, and B. Jarvis. 1977. Detection of food-associated microbes using electrical impedance measurements. *J. Appl. Bacteriol.* 43: 14～15.

[195] Zaadhof, K. J., and G. Terplan. 1981. Der *Limulus*-Test ein Verfahren zur Beurteilung der mikrobiologischen Qualitat von Milch und Milchprodukten. *Deut. Molkereizeitung* 34: 1094～1098.

[196] Zayaitz, A. E. K., and R. A. Ledford. 1982. Proteolytic inactivation of thermonuclease activity of *Staphylococcus aureus* during recovery from thermal injury. *J. Food Protect.* 45: 624～626.

12. 生物分析及相关技术

在介绍过食品中的病原体和毒素的检测方法后，下面将对这些微生物和毒素的生物活性进行探讨。研究者在此方面做了许多的动物实验，当动物实验不可行的时候，大量的组织培养实验得到了发展，从而提供了许多有关病原体及其毒素的生物活性的信息。在表 12.1 中选择列出了一些食品中病原体的生物分析及相关技术。

表 12.1　一些用于分析食品中各种病原体及其产物的生物活性的生物分析方法

微生物	毒素/产品	生物分析方法	灵敏度
A. hydrophila	细胞毒内毒素	幼鼠小肠试验	~30ng
金黄色芽孢杆菌	痢疾毒素	猴子饲养试验	
	同上	兔子回肠绑扎试验	
	同上	兔子皮肤试验	
	同上	几内亚猪皮试验	
	同上	老鼠致死试验	
	呕吐毒素	猕猴呕吐试验	
C. jejum	活细胞	成年老鼠试验	10^4 个细胞
	同上	小鸡试验	90 个细胞
	同上	刚出生幼鼠试验	
	表面培养物	成年老鼠空肠绑扎试验	
	内毒素	老鼠回肠绑扎试验	
肉毒梭菌	毒素 A，B，E，F，G	老鼠致死试验	
产气荚膜梭菌	内毒素	老鼠回肠绑扎 90min 试验	1.0μg
	同上	老鼠致死试验，LD_{50}	1.8μg
	同上	兔子回肠绑扎 90min 试验	6.25μg
	同上	几内亚猪皮试验（红疹反应）	0.06～0.125mg/mL
婴儿食物中毒菌	孢子内壁	出生 7～12d 的老鼠试验	1500 孢子
	同上	出生 9d 的老鼠试验	700 孢子
	同上	无菌成年老鼠试验	10 孢子
大肠杆菌	LT	兔子回肠绑扎 18h 试验	
	ST	幼鼠（水肿）试验	
	ST	兔子回肠绑扎 6h 试验	
	ST_a	幼鼠试验	
	ST_a	出生 1～3d 的小猪	
	ST_b	出生 7～9 周断奶的小猪试验	
大肠杆菌 O157：H7	ETEC	老鼠感染试验	
		感染试验	

续表

微生物	毒素/产品	生物分析方法	灵敏度
沙门氏菌	热不稳定性内毒素	兔子回肠绑扎试验（蛋白质合成抑制）	
金黄色葡萄球菌	SEB	几内亚猪皮特殊反应	0.1～1.0pg
	所有内毒素	猕猴呕吐试验	5μg/2.3kg 体重
	SEA，SEB	小猫呕吐试验	0.1，0.5μg/kg 体重
副溶血弧菌	液体培养物	兔子回肠绑扎试验 50%动物反应	10^2 个细胞
	活性细胞	成年兔子回肠绑扎试验（侵入性）	
	热稳性毒素	老鼠致死试验，1min 致死	5μg/老鼠
	同上	老鼠致死试验，LD_{50}	1.5μg
	同上	兔子回肠绑扎实验	250μg
	同上	几内亚猪皮试验	2.5μg/g
创伤弧菌	培养物过滤液	兔子皮肤渗透试验	
霍乱弧菌	内毒素	幼鼠实验	
小肠结肠炎耶尔森氏菌	热稳定性毒素	Sereny 试验	
	同上	幼鼠试验	110ng
	内毒素	兔子回肠绑扎 6h 和 18h 试验	
	活细胞	兔子痢疾试验	50%感染针剂量 2.9×10^4 个
	同上	I.P. 注射幼鼠致死试验	14 个细胞
	同上	I.P. 注射沙鼠致死试验	100 个细胞

注：LT 为热不稳定性毒素；ST 为热稳定性毒素；SEA 为葡萄球菌内毒素 A。

12.1 动物分析实验

12.1.1 鼠致死实验

在 1920 年，这一方法首次应用于食品中病原体的研究，以后则成为了一种重要的生物分析方法。检测食品中布特林菌毒素的实验中，将得到提取物部分用胰岛素处理。在不同老鼠体内分别注射 0.5mL 的经胰岛素处理和未经胰岛素处理的毒素制品。未处理制品在 100℃加热 10min 后注入一对老鼠体内。在 72h 内观察所有的被注射老鼠是否有布特林毒素中毒症状和死亡现象发生。被注射加热制品的老鼠不会死亡，因为布特林毒素的热稳定性差。此实验中得知可用专性布特林毒素抗体保护老鼠，同时对布特林毒素的专一血清型进行了鉴定（见第七部分 21 中的毒素类型）。

老鼠致死实验也可用于其它毒素的分析。Stark 和 Duncan[46]利用此方法对产气夹膜梭菌内毒素进行了研究。老鼠注射此内毒素后 72h 后死亡，使老鼠致死的针剂用 72h 杀死老鼠的最高稀释浓度的倒数来表示。Genigeorgis 等人[18]在实验中使用了静脉注射。产气夹膜梭菌内毒素用磷酸盐缓冲液稀释，pH 为 6.7，浓度达到 5～12μg/mL。取稀释液 0.25mL，注射入 6 只体重为 12～20g 的雄性老鼠体内后记录死亡数，计数得到 LD_{50}。老鼠是李斯特氏菌毒性分析中最常用的动物。单核细胞增生李斯特氏菌对一般成年老鼠的

LD_{50}为10^5～10^6，对15g的幼鼠注入50个细胞就可导致其死亡（参见第七部分22）。

12.1.2 幼鼠实验

这一实验方案由Dean等人设计[11]，主要用于大肠杆菌内毒素和其他一些食品病原体的研究。将幼鼠与母鼠分离，用皮下注射针头注射0.05～0.1mL的实验药剂。在药剂中滴加一滴5%/mL的Evans蓝色试剂，用于检测小肠内的药剂。幼鼠通常在25℃下饲养2h后死亡。将小肠完全切除，实验药剂的活性用小肠重与体重的比值（GW/BW）表示。Giannella实验发现大肠杆菌内毒素的GW/BW如下：阴性实验<0.074；中性实验（应有重复实验）0.075～0.082；阳性实验>0.083。研究者发现每天各种大肠杆菌的可变性为10.5%～15.7%，同一菌株的重复性实验大约为9%。Mullan等人进行的大肠杆菌ST_a实验中GW/BW为0.060被认为是阴性[37]。在对大肠杆菌ST的实验中，Wood等人[51]认为GW/BW>0.087的结果为阳性，而Boyce等人[5]在小肠结肠炎耶尔森氏菌热稳定性内毒素的研究中，将幼鼠在室温下饲养4h，认为GW/BW为0.083或更高时是阳性。在对小肠结肠炎耶尔森氏菌的研究中，Okamoto等人[36]将幼鼠在25℃饲养3h，认为GW/BW为0.83是阳性结果。

在幼鼠实验中，实验药剂可通过幼鼠的半透明皮肤注射，使药剂直接进入胃中。大量菌体的入侵使小肠明显膨胀，出现水肿[38]。研究大肠杆菌内毒素ST_a通常使用幼鼠和出生3d的小猪。ST_b对幼鼠无作用，但对猪崽和断奶的小猪有至病性[6,27]。幼鼠实验不适用于霍乱或大肠杆菌热不稳定性毒素（LT）的研究分析。对出生6h的小兔回肠注射实验药剂也可用于大肠杆菌ST_a的研究。

幼鼠已经用于通过药剂注射的致死性病菌研究。Aulisio等人用3d的瑞士幼鼠做实验，在幼鼠体内注射0.1mL的菌悬液。经过对幼鼠7d的观察，24h内死亡的被认为对小肠耶尔森氏菌无特异性，在2～7d内死亡的则被认为对小肠耶尔森氏菌有特异性。使用这种方法，可计算LD_{50}。在研究中Aulisi等人发现LD_{50}为14个细胞，细鼠的平均死亡时间为3d。

12.1.3 兔和老鼠实验痢疾病研究

兔和老鼠可以用于一些食品中痢疾病菌的研究。以500～800g的小兔做实验。Pai等人[37]将大约10^{10}个小肠结肠炎耶尔森氏菌细胞悬浮于10%的碳酸氢钠溶液中，用于注射，5.4d后47只兔子中有87%患有痢疾。

在对小肠耶尔森氏菌的痢疾病菌活性的检测实验中，Schiemann[42]对实验老鼠24h不供水，动物的病菌感染量为10^9个细胞/mL蛋白胨溶液，被感染动物在24h后才供给新的饮用水，2d后检查老鼠的粪便找寻痢疾症状。

Smith[43]使用小兔对大肠杆菌和霍乱弧菌的内毒素进行研究。6～9d的小兔被注入1～5mL的菌液。在送回母兔中后，小兔被发现患有痢疾，6～8h后检测为痢疾阳性。在死亡的动物大肠和小肠内发现有大量黄水存在。内毒素的定量用肠体重量与总体重的比值表示。小猪也可采用相似方法进行大肠杆菌内毒素的研究。小兔还用于大肠杆菌似Shiga毒素的研究[34]。

12.1.4 猴子饲养实验

1931 年，Jordan 和 McBroom[26]将猕猴用于葡萄球菌内毒素的研究。猕猴对葡萄球菌内毒素的敏感性仅次于人类。当使用此方法研究内毒素时，研究者选用 2～3kg 的猕猴做实验。食品样品通常用 50mL 水溶解后喂入猕猴体内，然后对动物连续观察 5h，6 只猴子中至少有两只发生呕吐则实验结果为阳性。内毒素 A 和 B 的食用量为 5μg/kg 体重时，猕猴就会有病症出现[31]。

12.1.5 小猫实验

Dolman 等人[14]在研究葡萄球菌内毒素时使用小猫做实验。在原始实验中将样品过滤注入 250～500g 小猫的腹腔内，这种方法会导致假阳性结果。最常用的方法是用滤液喂养小猫，可观察到连续呕吐。当实验小猫体重为 2～4kg 时，在 2～6h 就有阳性结果产生[9]；当葡萄球菌内毒素 SEA 和 SEB 的食用量为 0.1～0.5μg/kg 体重时，就会发生呕吐[3]。由于猴子饲养实验中所用的葡萄球菌培养物滤液中含有其它导致呕吐的副产品，所以实验缺乏专一性。因为小猫比猕猴容易得到且容易饲养，所以更有实验价值。

12.1.6 兔皮和几内亚猪皮实验

这两种动物的皮可以用来分析毒素的特性。在血管渗透实验中经常使用体重为1.5～2.0kg 的白化病兔子，采用皮下注射方法将培养物的滤液从兔子背部和体侧的无毛区注入体内。2～18 个 h 后注入 Evans 蓝色染液，1～2h 内染液渗出后测量两个蓝色区域的直径，并取平均值。再用其平方值估计区域面积，面积值为 25cm² 时为阳性。在此分析中大肠菌 LT 为阳性结果[16]。通过此实验分析，可知大肠杆菌痢疾毒素具有渗透功能。

也使用几内亚猪进行与渗透实验相似的红疹作用实验。Stark 和 Duncan[46]采用此方法研究产气夹膜梭菌内毒素的红疹作用。体重为 300～400g 的几内亚猪的背部和体侧被去毛，制成 2.5cm² 的区域，然后在区域中心注射 0.05mL 的毒素样品。在 18～24h 内注射区域会形成红疹；在产气夹膜梭菌内毒素的研究中，红疹区域并不出现坏死。研究者将一个红疹单位定义为内毒素产生的直径为 0.8cm 的红疹区域。Stark 和 Duncan 使用的内毒素样品液含有 1000 红疹单位/mL。为增加可视性，在皮下注射后，可注射 1mL 的 0.5%的 Evans 蓝色染液，80min 后可测量区域直径[18]。用于产气夹膜梭菌内毒素研究的红疹实验比兔子回肠实验的灵敏度高 1000 倍[28]。

12.1.7 Sereny 和 Anton 实验

Sereny 方法被用于各种细菌培养物毒性的研究。此方法由 Sersny 在 1955 年提出的，实验中最常用的也是几内亚猪。实验中使用磷酸缓冲液制备浓度为（1.5×10^{10}～2.3×10^{10}）个/mL，将样品注入体重为 400g 的几内亚猪的角膜。5d 中对动物的眼睛每天进行检查，记录结膜炎症状。实验研究菌株是否具有毒性，同时实验研究菌株的阴性和阳性也很重要。

在 Sereny 老鼠实验中，使用瑞士老鼠做实验，所用试剂量为上述的一半。大肠杆菌

菌株的 Sereny 实验得到了快速发展和应用[33]。

Anton 实验与 Sereny 实验相似，被用于李斯特氏菌的毒性分析。当在兔子或几内亚猪的眼睛中滴加 10^6 单核细胞增生李斯特氏菌细胞时就会有角膜炎发生[1]。

12.2 动物实验中的外科手术处理技术

12.2.1 绑扎环技术

这一技术的使用是由于感染疾病的动物会因内毒素引起小肠内液体存积。研究中许多动物都可使用此技术处理，但经常使用的是兔子。实验用兔子为 7～20 周的小兔，体重 1.2～2.0kg，在外科手术前 24h 内停止进食和饮水，或停止进食 48～72h，不控制饮水量。手术时先局部麻醉，然后穿过腹部肌肉和腹膜在中线切开 5.08cm 长刀口，使小肠暴露[10]。在小肠的中部或阑尾以上的部位用 8～12cm 的绸带或合适的绷带绑扎，绑扎区域至少长 1cm，一条或两条绷带大约可包扎 6 个区域。

在手术的同时，将悬浮于无菌盐水中的样品从手术区域注射，一般注射量为 1mL 左右。注射样品时，在每相临两个区域注射或隔一个区域注射一次，有时在一个区域注射样品在相临区域仅注射无菌盐水。注射完成后，将腹部刀口缝合，动物的麻醉解除。恢复的动物再停止进食和饮水 18～24h，或仅停止进食或饮水。经过手术后的动物能存活大约 30～36h[7]。

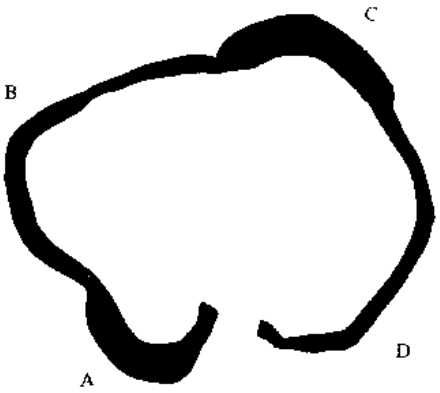


图 12.1 注射 2mL 于 37℃脱脂牛乳中培养 4h 的 Clostridium Perfringens 培养液 24h 后绑扎的兔子回肠外观，绑扎 A，注射 NCTC 8798 菌株，有 8mL 存积液体；绑扎 B 注射 2mL 灭菌牛乳，阴性绑扎；绑扎 C，注射菌株 F65，有 10mL 存积液体，绑扎 D，注射菌株 6867，阴性绑扎

实验的动物死亡后，检查绑扎区域，测量液体积存量。液体被吸出测量，结果用绑扎区域液体体积与绑扎长度的比值表示[7]，或是用每毫克小肠干重的液体体积表示[30]。在图 12.1 中表示了注射产气夹膜梭菌培养物 24h 后的兔子回肠的外观。在绑扎区域注射的产气夹膜梭菌内毒素最少量为 28～40μg，最大量为 125μg。在 90min 的绑扎实验中内毒素的最少反应量为 6.25μg，在标准实验中最少反应量为 29μg[18]。

这一技术被应用于霍乱等致病菌的研究[10]。它还被广泛用于食品病原体和毒素物质的研究，如金黄色芽孢杆菌、产气夹膜梭菌、大肠杆菌和副溶血弧菌。

绑扎环实验中经常使用兔子，有时也使用其它动物做实验。老鼠绑扎环实验用于大肠杆菌内毒素的研究。在 Punyashthiti 和 Finkelstein[40]的实验中是使用 18～22g 的瑞士鼠，手术前 8h 停止进食。在光麻醉下进行手术，在两个 6cm 的绑扎环中间加入一个 1cm 的中间绑扎环，在绑扎区域注射 0.2mL 待检样品，然后将腹部缝合。手术后动物停止进食和饮水，8h 后死亡。测量绑扎区的存积液体量和绑扎长度，得到检测结果，即二者的

比值。当比值为 50mg/cm 或更高时，结果为阳性。在此实验中，阳性绑扎区比值为 50～100，有时会接近 200 或更高。有时用检测的绑扎区的增重量表示毒素的反应强度[52]。老鼠绑扎环实验中可检测毒素量为 1μg[52]。在研究大肠杆菌内毒素 ST_b 的实验中也使用了此方法。当老鼠体内的蛋白酶活力被大豆胰岛素所抑制时，可检测得到每只 250～350g 的老鼠使用的注射量[49]。

12.2.2 RITARD 实验

Spira 等人[45]在实验中使用了将患痢疾的成年兔除去肠体绑扎（RITARD）技术。以体重为 1.6～2.7kg 的兔子做实验，手术前停止进食 24h，不控制饮水量。手术时对动物进行局部麻醉，切开腹部使盲肠暴露，在接近回肠的连接处进行绑扎。然后取出小肠在阑尾系膜处打结，在前面的空肠空腔内注射 10mL 磷酸缓冲液制备的实验样品。注射结束后，将小肠和盲肠放回腹腔中，将刀口缝合。动物在箱中喂养，2～4h 后绑扎带被除去，小肠打结处被解除。此时，动物被放回笼中，开始进食和饮水。以后的 124h 中，每 2h 观察记录一次，动物会出现腹泻或死亡。在检验尸体时，小肠和相临部位被绑扎和切除以测量液体量。产内毒素的大肠杆菌菌株可引起严重水状腹泻，在此实验中，成年兔子对产气夹膜梭菌的感染灵敏度与幼兔相似。

RITARD 实验中将动物的盲肠绑扎是为了防止它从小肠吸取液体，而在接近回肠处暂时性打结是为了使注射菌体在小肠内生长。此方法已成功用于空肠弯曲杆菌[8]和气单胞菌菌株[39]毒性的研究。

12.3 细胞培养体系

许多细胞培养体系用于分析各种细胞的一些病原体特性。这些特性有入侵性、渗透性、细胞毒性和黏性或结合性以及其它一些生物活性。一些细胞培养体系应用于内毒素和毒素的各种特性分析。在表 12.2 中总结了一些有关实验，下文中将对此进行简单介绍。

表 12.2 用于研究引起肠胃炎的微生物及其产物的生物活性的组织和细胞培养体系（摘自文献）

培养体系	病原体/毒素	论证/应用
CHO 单层细胞	大肠杆菌；霍乱弧菌毒素	生物活性
	副溶血弧菌	生物活性
	沙门氏菌毒素	生物活性
	C. jejuni 内毒素	生物活性
CHO 漂浮细胞分析	沙门氏菌毒素	生物活性
HeLa 细胞	大肠杆菌	入侵性
	小肠结肠炎耶尔森氏菌	入侵性
	副溶血弧菌	黏附性
	C. jejuni	入侵性

续表

培养体系	病原体/毒素	论证/应用
Vero	大肠杆菌 O157：H7	似 Shiga 毒素受体
Vero 细胞	产气荚膜梭菌内毒素	反应方式
	大肠杆菌 LT	生物活性，分析
	A. hydrophila 毒素	细胞毒性
	产气荚膜梭菌内毒素	结合性
	产气荚膜梭菌内毒素	生物活性
	沙门氏菌胞内毒素	蛋白质合成抑制因子
	创伤弧菌	细胞毒性
Y-1 肾上腺细胞	大肠杆菌 LT	生物活性，分析
	霍乱弧菌毒素	生物活性，分析
	最小弧菌	生物活性
兔子 int. epith 细胞	产气荚膜梭菌内毒素	结合性
	沙门氏菌细胞毒素	蛋白质合成抑制因子
老鼠脾脏细胞	葡萄球菌内毒素 A、B、E	结合性
巨噬细胞	小肠结肠炎耶尔森氏菌	噬菌法
人体外胸腺依赖性细胞	葡萄球菌内毒素 A	生物反应
人类喉癌	大肠杆菌、沙门氏菌	入侵性
Henele407 人类小肠	大肠杆菌，沙门氏菌	入侵性
Henele407	单核细胞增大李斯特氏菌	入侵性
	大肠杆菌 O157：H7	黏附性
Caco-2	霍乱弧菌 non-01	黏附性
	ETEC	黏附性
	单核细胞增生李斯特氏菌	入侵性
HT29-74	*C. parvum*	感染方式
	产气荚膜梭菌	细胞致死性
腹膜巨噬细胞	单核细胞增生李斯特氏菌	胞内存活性
鼠类胚胎纤维原细胞	单核细胞增生李斯特氏菌	白细胞间介素的产生
人类胎儿肠体细胞	副溶血弧菌	黏附性
	致病性大肠杆菌	黏附性
	金黄色芽孢杆菌毒素	生物活性
人类肠体细胞	副溶血弧菌	黏附性
人体回肠细胞	致病性大肠杆菌	黏附性
人体黏膜细胞	大肠杆菌	黏附性
	副溶血弧菌	黏附性
人体 UToepithelial 细胞	大肠杆菌	黏附性
人体十二指肠活性组织切片	大肠杆菌	黏附性
老鼠血细胞	产气荚膜梭菌内毒素	氨基酸传递
	产气荚膜梭菌内毒素	膜渗透性
儿内亚猪肠体细胞	副溶血弧菌	黏附性

12.3.1 人类黏膜细胞

在 Ofek 和 Beachey[35]的实验中，将人体口腔黏膜细胞（2×10^5 个悬浮于磷酸盐缓冲液中）和 0.5mL 大肠杆菌细胞（2×10^8 个/mL）混合。将混合液在室温下震摇 30min。通过离心将上皮细胞与细菌细胞分离，干燥后用龙胆紫染色。通过显微计数细菌细胞数量与上皮细胞数量的比值检测细胞黏附性。Thorne 等人[48]在实验中将大肠杆菌细胞用^3H-氨基酸（丙氨酸和亮氨基）或荧光异硫氰酸盐标记；在 Reyes 等人[41]的实验中，使用副溶血弧菌细胞与口腔上皮细胞相混合，在 37℃下培养 5min 后过滤。没有黏附的细胞被洗去，然后培育物被干燥，固定，用 Giemsa 试剂染色。通过计数每 50 个口腔细胞黏附的副溶血弧菌总数来评定细胞的黏附性。当 5min 后，在 pH7.2 的磷酸盐缓冲液中计数得到 10^7 个细菌细胞和 10^5 个口腔细胞时，实验结果最好。研究者对 12 个菌株进行了黏附性分析，结果表明副溶血弧菌的黏性与病原性没有任何关系。

12.3.2 人类胎儿肠细胞

在此黏附性检测实验中，使用了人类胎儿肠细胞（HFI）单层细胞。单层细胞被完全冲洗后接种副溶血弧菌，在 37℃下培养 30min。洗去非黏附性细胞后，显微计数菌株数量以评定细胞的黏附性。在所有的检测菌株中，从中毒食品中分离的菌株的黏附性最大[27]。通过这种方法还发现从人体中分离得到的一株致肠病大肠杆菌（E. coli）的以质粒为媒介的黏附作用。

12.3.3 人类回肠和小肠细胞

在研究大肠杆菌内毒素（ETEC）黏附性的实验中，Deneke 等人[12]使用了成人回肠细胞做过滤-黏结分析。细胞与在^3H-氨基酸（丙氨酸和亮氨酸）培养基上培养的细菌相混合。通过发光计数可发现大量细胞黏附现象。人体器官的 ETEC 有很强的黏附性，是人体口腔细胞黏附性的 10～100 倍。

Gingras 和 Howard[20]在研究副溶血弧菌的黏附性实验中使用了单层人体小肠细胞。细菌细胞在^{14}C 标记的缬氨酸培养基中培养，标记的细菌细胞加入单层细胞中培养 60min，洗去非黏附细胞，通过荧光计数器计数黏附细胞，也可显微计数。实验发现 Kanagawa 阳性和阴性细胞的黏附性相似。实验证明细胞的溶血性与黏附性没有关系。

12.3.4 几内亚猪小肠细胞

在研究副溶血弧菌的黏附性实验中，Iijima 等人[25]使用了 300g 的成年几内亚猪。在实验前停止进食 2d，经麻醉后切开腹部，在距离胃 3cm 的小肠末端绑扎。在小肠内注射 1.0mL 黏附阳性和阴性菌株的菌悬液，含细胞 2×10^8 个，然后将刀口缝合。6h 后动物死亡，取出小肠分为四部分，用 3%的盐水冲洗得到均匀菌悬液，液体中的细胞数由平板计数。在菌悬液中有大量的黏附性阳性细胞存在，特别是上部小肠的菌悬液中。

另一个黏附性分析实验中，将老鼠的可溶性黏膜糖蛋白固定于聚丙烯上[28]。在此实验中，研究者发现两种含质粒的大肠杆菌菌株（K88 和 K99）具有黏附性。

12.3.5 HeLa 细胞

此方法广泛用于分析肠体内病原体的侵入性和黏附性。除了可使用 HeLa 细胞外，人类喉癌细胞和 Henle407 人肠体细胞也可使用。经斜面培养制备单层细胞，然后接种 0.2mL 实验待检样品，在 35℃下培养 3h，使细菌生长。冲洗单层细胞后固定和染色，在光学显微镜下观察。在大肠杆菌的入侵性分析实验中，细胞存在于单层细胞的细胞质内，而并非在核酸区域存在。入侵性细胞被吞噬数量明显多于非入侵性细胞，细菌数/细胞数>5。在《细菌学分析手册》中记载，至少有 0.5%的 HeLa 细胞中含有细菌数不少于 5 个。本实验的阳性结果可以得到 Sereny 实验的证明[17]。

在耶尔森氏菌入侵性分析实验中，0.2mL 的细菌菌悬液接种入含有 HeLa 单层细胞的斜面。在 35℃恒温培养 1.5h，细胞经冲洗、固定和染色后在显微镜下检测。入侵性小肠结肠炎耶尔森氏菌存在于细胞质中，通常在吞噬溶酶体中，发生率高于 10%。Sereny 实验对入侵性大肠杆菌阳性实验进行了确定，但对小肠耶尔森氏菌却不能确定，因为此微生物不能产生阳性 Sereny 实验结果。

HeLa 细胞常用于分析副溶血弧菌的黏性和小肠耶尔森氏菌的渗透性。后者菌株指数为 3.7～5.0 的具有渗透性[42]。研究者通过使用斜面单层 HeLa 细胞对被小肠耶尔森氏菌感染的细胞进行研究，在 24h 内随意选取 100 个染色的 HeLa 细胞对入侵细菌进行计数[13]。

12.3.6 中国仓鼠卵巢细胞（CHO）

在研究大肠杆菌内毒素的实验中，Guerrant 等人[21]使用了 CHO 分析方法，将 CHO 细胞在含牛犊血清的培养基中培养，培养物生长后添加内毒素。24～30h 后经显微检测细胞是否由球形变为两极形，至少被拉长为其宽度的 3 倍。CHO 细胞的形态变化是由霍乱毒素和大肠杆菌内毒素引起的。此实验对大肠杆菌的灵敏性是皮下渗透实验和回肠绑扎实验的 100～10 000 倍，对大肠杆菌 LT 的研究中，CHO 细胞培养法的灵敏性是皮下渗透实验和兔子回肠绑扎实验分析的 5～100 倍[2,5]。

12.3.7 Vero 细胞

在研究大肠杆菌 LT 的实验中，Speirs 等人[44]使用了从非洲绿色猴子肾状石得到的单层细胞，使用 Vero 细胞与 Y-1 肾上腺细胞相比，实验更简单和经济。产毒素的菌株对 Vero 细胞具有变形作用。在第七部分 24 中将讨论用 Vero 细胞研究大肠杆菌内毒素。

McDonel 和 McClane[29]对实验进行改进使 Vero 细胞对产气夹膜梭菌内毒素的生物学分析的灵敏性和重现性更高。实验分析是以对内毒素抑制 Vero 细胞在培养基上生长的观察为基础的。0.1ng 的内毒素就会抑制细胞的生长，研究者实验得到 0.5～5ng 范围内的毒素与细胞的关系曲线。作者提出了一种新的生物活性单位，即平板培养效率单位（PEU），PEU 定义为接入 100μL 培养基平板上 200 个细胞中的 25%受到抑制的内毒素的量。

12.3.8 Y-1肾上腺细胞鉴定

在此方法中，使用标准细胞培养技术使老鼠肾上腺细胞（Y-1）生长形成单层。单层细胞在微量平板上培养，实验检测提取物被加入平板中，在37℃再培养。在实验中将已知阳性和阴性LT菌株的加热和未加热培育物滤液加入微量平板的单层细胞中，然后用显微镜检测结果。实验结果发现在单层细胞中有50%的未加热滤液细胞，有10%或更少的加热滤液细胞存在，此结果为阳性。在含有毒素的滤液中使用专一抗体进行实验，可以检测专一性。在BAM中对此方法在食品病原体研究中的应用有详尽介绍[17]。

12.3.9 其它鉴定方法

在Boutin等人[4]的实验中使用了一种免疫荧光技术，以6周的兔子做实验，在小兔的回肠绑扎区域接种副溶血弧菌。在接种12～18h后除去绑扎区域，放置盘中，切片，清洗。切片组织被固定，并用连有副溶血弧菌的荧光异硫氰酸盐染色。显微观察标记抗体和副溶血弧菌细胞的反应。通过免疫荧光技术可以阐明病原体渗入回肠组织切片的过程和组织切片的被侵入性。利用此方法实验发现Kanagawa阴性和阳性菌都可侵入组织切片中。

在对李斯特氏菌的病原体研究中使用10d的小鸡晶胚的绒膜尿囊做实验。在2～5d内单核细胞增生李斯特氏菌可引起100个细胞的死亡。如果每个鸡蛋中含有100～30 000个依氏李斯特氏菌细胞，则72h后鸡蛋死亡[47]。将单核细胞增生李斯特氏菌和依氏李斯特氏菌的培育物滤液接种于老鼠肝细胞，3h内就有乳酸盐脱氢酶生成，其他的李斯特菌种没有此反应发生[24]。

参 考 文 献

[1] Anton, W. 1931. Kritisch-experimenteller Beitrag zur Biologie des Bacterium monocytogenes. Mit besonderer Berucksichtigung seiner Beziehung zue infektiosen Mononucleose des Menschen. *Zbt. Bakteriol. Abt. I. Orig.* 131: 89～103.

[2] Aulisio, C. C. G., W. E. Hill, J. T. Stanfield, and J. A. Morris. 1983. Pathogenicity of *Yersinia enterocolitica* demonstrated in the suckling mouse. *J. Food Protect.* 46: 856～860.

[3] Bergdoll, M. S. 1972. The enterotoxins. In *The Staphylococci*, ed. J. O. Cohen, 301～331. New York: Wiley.

[4] Boutin, B. K., S. F. Townsend, P. V. Scarpino, and R. M. Twedt. 1979. Demonstration of invasiveness of *Vibrio parahaemolyticus* in adult rabbits by immunofluorescence. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 647～653.

[5] Boyce, J. M., D. J. Evans, Jr., D. G. Evans, and H. L. DuPont. 1979. Production of heatstable, methanol-soluble enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 25: 532～537.

[6] Burgess, M. N., R. J. Bywater, C. M. Cowley, N. A. Mullan, and P. M. Newsome. 1978. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21: 526～531.

[7] Burrows, W., and G. M. Musteikis. 1966. Cholera infection and toxin in the rabbit ileal loop.

J. Infect. Dis. 116: 183～190.

[8] Caldwell, M. B., R. I. Walker, S. D. Stewart, and J. E. Rogers. 1983. Simple adult rabbit model for *Campylobacter jejuni* enteritis. *Infect. Immun.* 42: 1176～1182.

[9] Clark, W. G., and J. S. Page. 1968. Pyrogenic responses to staphylococcal enterotoxins A and B in cats. *J. Bacteriol.* 96: 1940～1946.

[10] De, S. N., and D. N. Chatterje. 1953. An experimental study of the mechanism of action of *Vibrio cholerae* on the intestinal mucous membrane. *J. Path. Bacteriol.* 66: 559～562.

[11] Dean, A. G., Y. -C. Ching, R. G. Williams, and L. B. Harden. 1972. Test for *Escherichia coli* enterotoxin using infant mice: Application in study of diarrhea in children in Honolulu. *J. Infect. Dis.* 125: 407～411.

[12] Deneke, C. F., K. McGowan, G. M. Thorne, and S. L. Gorbach. 1983. Attachment of enterotoxigenic *Escherichia coli* to human intestinal cells. *Infect. Immun.* 39: 1102～1106.

[13] Devenish, J. A., and D. A. Schiemann. 1981. HeLa cell infection by *Yersinia enterocolitica*: Evidence for lack of intracellular multiplication and development of a new procedure for quantitative expression of infectivity. *Infect. Immun.* 32: 48～55.

[14] Dolman, C. E., R. J. Wilson, and W. H. Cockroft. 1936. Anew method of detecting *Staphylococcus* enterotoxin. *Can. J. Pub. Hlth.* 27: 489～493.

[15] Duncan, C. L., H. Sugiyama, and D. H. Strong. 1968. Rabbit ileal loop response to strains of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 95: 1560～1566.

[16] Evans, D. J., Jr., D. G. Evans, and S. L. Gorbach. 1973. Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infect. Immun.* 8: 725～730.

[17] *FDA Bacteriological Analytical Manual*, 8th ed. 1995. McLean. VA: Association of Official Analytical Chemists Int.

[18] Genigeorgis, C., G. Sakaguchi, and H. Riemann. 1973. Assay methods for *Clostribium perfringens* type A enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 26: 111～115.

[19] Giannella, R. A. 1976. Suckling mouse model for detection of heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin: Characteristics of the model. *Infect Immun.* 14: 95～99.

[20] Gingras, S. P., and L. V. Howard. 1980. Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* to human epithelial cell lines. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 369～371.

[21] Guerrant, R. L., L. L. Brunton, T. C. Schaitman, L. L. Rebhun, and A. G. Gilman. 1974. Cyclic adenosine monophosphate and alteration of Chinese hamster ovary cell morphology: A rapid, sensitive in vitro assay for the enterotoxins of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 10: 320～327.

[22] Hackney, C. R., F. G. Kleeman, B. Ray, and M. L. Speck. 1980. Adherence as a method for differentiating virulent and avirulent strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 652～658.

[23] Hauschild, A. H. W. 1970. Erythemal activity of the cellular enteropathogenic factor of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* 16: 651～654.

[24] Huang, J. C., H. S. Huang, M. Jurima-Romet, F. Ashton, and B. H. Thomas. 1990. Hepatocidal toxicity of *Listeria* species. *FEMS Microbiol. Lett.* 72: 249～252.

[25] Iijima, Y., H. Yamada, and S. Shinoda. 1981. Adherence of *Vibrio parahaemolyticus* and its relation to pathogenicity. *Can. J. Microbiol.* 27: 1252～1259.

[26] Jordan, E. O., and J. McBroom. 1931. Results of feeding *Staphylococcus* filtrates to monkeys. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* 29: 161～162.

[27] Kennedy, D. J., R. N. Greenberg, J. A. Dunn, R. Abernathy, J. S. Ryerse, and R. L. Guerrant. 1984. Effects of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin ST_1 on intestines of mice, rats, rabbits, and piglets. *Infect. Immun.* 46: 639～641.

[28] Laux, D. C., E. F. McSweegan, and P. S. Cohen. 1984. Adhesion of enterotoxigenic *Escherichia coli* to immobilized intestinal mucosal preparations: A model for adhesion to mucosal surface components. *J. Microbiol. Meth.* 2: 27～39.

[29] McDonel, J. L., and B. A. McClane. 1981. Highly sensitive assay for *Clostridium perfringens* enterotoxin that uses inhibition of plating efficiency of Vero cells grown in culture. *J. Clin. Microbiol.* 13: 940～946.

[30] Mehlman, J. J., M. Fishbein, S. L. Gorbach, A. C. Sanders, E. L. Eide, and J. C. Olson, Jr. 1976. Pathogenicity of *Escherichia coli* recovered from food. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 59: 67～80.

[31] Minor, T. E., and E. H. Marth. 1976. *Staphylococci and Their Significance in Foods.* New York: Elsevier.

[32] Mullan, N. A., M. N. Burgess, and P. M. Newsome. 1978. Characterization of a partially purified, methanol-soluble heat-stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice. *Infect. Immun.* 19: 779～784.

[33] Murayama, S. Y., T. Sakai, S. Makino, T. Kurata, C. Sasakawa, and M. Yoshikawa. 1986. The use of mice in the Sereny test as a virulence assay of shigellae and enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 51: 696～698.

[34] O'Brien, A. D., and R. K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206～220.

[35] Ofek, I., and E. H. Beachey. 1978. Mannose binding and epithelial cell adherence of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 22: 247～254.

[36] Okamoto, K., T. Inoue, K. Shimizu, S. Hara, and A. Miyama. 1982. Further purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35: 958～964.

[37] Pai, C. H., V. Mors, and T. A. Seemayer. 1980. Experimental *Yersinia enterocolitica* enteritis in rabbit. *Infect. Immun.* 28: 238～244.

[38] Pai, C. H., V. Mors, and S. Toma. 1978. Prevalence of enterotoxigenicity in human and nonhuman isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 22: 334～338.

[39] Pazzaglia, G., R. B. Sack, A. L. Bourgeois, J. Froehlich, and J. Eckstein. 1990. Diarrhea and intestinal invasiveness of *Aeromonas* strains in the removable intestinal tie rabbit model. *Infect. Immun.* 58: 1924～1931.

[40] Punyashthiti, K., and R. A. Finkelstein. 1971. Enteropathogenicity of *Escherichia coli*. I. Evaluation of mouse intestinal loops. *Infect. Immun.* 39: 721～725.

[41] Schiemann, D. A. 1981. An enterotoxin-negative strain of *Yersinia enterocolitica* serotype O: 3 is capable of producing diarrhea in mice. *Infect. Immun.* 32: 571～574.

[42] Smith, H. W. 1972. The production of diarrhea in baby rabbits by the oral administration of cell-free preparations of enteropathogenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*: The effect of antisera *J.*

Med. Microbiol. 5: 299～303.

[43] Speirs, J. I., S. Stavric, and J. Konowalchuk. 1977. Assay of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin with Vero cells. *Infect. Immun.* 16: 617～622.

[44] Spira, W. M., R. B. Sack, and J. L. Froehlich. 1981. Simple adult rabbit model for *Vibrio cholerae* and enterotoxigenic *Escherichia coli* diarrhea. *Infect. Immun.* 32: 739～747.

[45] Stark, R. L., and C. L. Duncan. 1971. Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* 4: 89～96.

[46] Terplan, G., and S. Steinmeyer. 1989. Investigations on the pathogenicity of *Listeria* spp. by experimental infection of the chick embryo. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 277～280.

[47] Thorne, G. M., C. F. Deneke, and S. L. Gorbach. 1979. Hemagglutination and adhesiveness of toxigenic *Escherichia coli* isolated from humans. *Infect. Immun.* 23: 690～699.

[48] Whipp, S. C. 1990. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect. Immun.* 58: 930～934.

[49] Williams, P. H., M. I. Sedgwick, N. Evans, P. J. Turner, R. H. George, and A. S. McNeish. 1978. Adherence of an enteropathogenic strain of *Escherichia coli* to human intestinal mucosa is mediated by a colicinogenic conjugative plasmid. *Infect. Immun.* 22: 393～402.

[50] Wood, L. V., W. H. Wolfe, G. Ruiz-Palacios, W. S. Foshee, L. I. Corman, F. McCleskey, J. A. Wright, and H. L. DuPont. 1983. An outbreak of gastroenteritis due to a heat-labile enterotoxin-produced strain of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 41: 931～934.

[51] Yamamoto, K., I. Ohishi, and G. Sakaguchi. 1979. Fluid accumulation in mouse-ligated intestine inoculated with *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 181～186.

第五部分　食品的保藏及嗜冷、嗜热、抗辐射细菌的特性

13. 食品的化学保藏

使用化学品来防止和延缓食品的腐败源于这样一个事实：这类化学品能成功地治愈人类、动物和植物的一些疾病。但这并不暗示所有有治疗作用的化学品都可以或可能被用作食品防腐剂。另一方面，一些可以作为食品防腐剂的化学品用于治疗，则可能是无效的或对人体毒性太大。除了一些特定的抗生素，现在使用的食品防腐剂没有一种真正被用作人和动物的治疗药物。虽然，大量的化学药品被认为可作为潜在的食品防腐剂，但只有相对少数的被允许用于食品产品中。这主要是因为美国FDA（食品与药物管理局）有严格的安全法规，同时也因为不是所有在玻璃试管内有抗菌活性的化合物当其加入至食品中时也有此功效。下面论述的是那些使用最普遍的化学防腐剂、它们的作用方式及适宜使用它们的食品类型。表13.1列出的是那些被公认为安全（GRAS）的化学防腐剂。

表 13.1　　一些公认为安全（GRAS）的食品防腐剂

防腐剂	最大允许量	抑制的微生物	应用
丙酸/丙酸盐	0.32%	霉菌	面包、蛋糕、一些奶酪、面包面团黏丝病抑制剂
山梨酸/山梨酸盐	0.2%	霉菌	硬奶酪、无花果、糖浆、沙拉调味料、果冻、蛋糕
苯甲酸/苯甲酸盐	0.1%	酵母和霉菌	人造奶油、泡菜、苹果酒、软饮料、番茄酱、沙拉调味品
对羟基苯甲酸酯[a]	0.1%[b]	酵母和霉菌	焙烤制品、软饮料、泡菜、沙拉调味料
SO_2/亚硫酸盐	200～300mg/kg	昆虫、微生物	糖蜜、干果、白酒、柠檬汁（不能用于作维生素B_1来源的肉或其它食品中）
环氧乙烷/1,2-环氧丙烷	700mg/kg	酵母、霉菌、寄生虫	香料和坚果的抗真菌剂
双乙酸钠	0.32%	霉菌	面包
乳酸菌素	1%	乳酸菌、梭状芽孢杆菌	巴斯德杀菌奶酪的涂布
脱氢醋酸	65mg/kg	昆虫	草莓、南瓜的杀虫剂
亚硝酸钠[c]	120mg/kg	梭状芽孢杆菌	腊肉制作

续表

防腐剂	最大允许量	抑制的微生物	应用
辛酸	—	霉菌	奶酪
甲酸乙酯	15～200mg/kg[a]	酵母和霉菌	干果、坚果

[a] 对羟基苯甲酸甲酯、丙酯和庚酯。

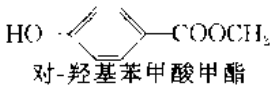
[b] 庚酯在啤酒中为 12mg/kg；在无碳酸盐存在和以水果为基料的饮料中为 20mg/kg。

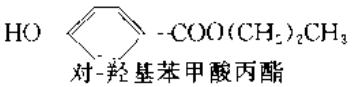
[c] 可能有致畸或致癌性。

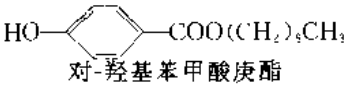
[d] 同甲酸。

13.1　苯甲酸和对羟基苯甲酸酯

在这一节中一起讨论的有苯甲酸及其钠盐和对羟基苯甲酸酯。苯甲酸钠是第一种 FDA 允许在食品中使用的化学防腐剂，时至今日它仍广泛地应用在许多食品中。其一些已被确认的衍生物的结构式如下：


对-羟基苯甲酸甲酯


对-羟基苯甲酸丙酯


对-羟基苯甲酸庚酯

苯甲酸盐的抗菌活性与 pH 有关，在低 pH 下可达到最大的抑菌效果。其未解离的分子有抗菌活性（见下）。这类化合物在低 pH 食品中有抗菌特性，当 pH 接近中性时基本无效。苯甲酸盐的 pK 为 4.20，在 pH 为 4.0 时，60%的该化合物处于未解离状态，而在 pH 为 6.0 时，只有 1.5%处于未解离态。因此，苯甲酸及其钠盐只能适用于高酸性食品，如苹果汁、软饮料、番茄酱和沙拉调味料等。在这些食品中，高酸性对抑制细菌生长是非常有效的，但对某些霉菌和酵母则不然。尽管苯甲酸盐在 50～500mg/kg 浓度范围内对一些细菌也有抑制作用，但在酸性食品中，苯甲酸盐的主要作用通常是作为一种霉菌和酵母的生长抑制剂。在 pH 为 5.0～6.0 时，抑制酵母的浓度为 100～500mg/kg，抑制霉菌的浓度为 30～300mg/kg。

在诸如果汁等食品中，当苯甲酸盐达到最大使用浓度 0.1%时，制品会产生不愉快的味道，这种味道被描述为“胡椒味”或“麻辣味”。

在美国，允许在食品中使用的三种对-羟基苯甲酸酯分别是：对-羟基苯甲酸庚酯、对-羟基苯甲酸甲酯及对-羟基苯甲酸丙酯。在其它某些国家允许使用对-羟基苯甲酸丁酯及对-羟基苯甲酸乙酯。作为对-羟基苯甲酸酯，它们与苯甲酸盐不同之处在于：前者的抗菌活性对 pH 的敏感性要低。虽然有关对 羟基苯甲酸庚酯的资料不多，但它确有很强的抑菌性，10～100mg/kg 可完全抑制一些革兰氏阳性和阴性菌。在同等浓度下，对-羟基苯甲酸丙酯的抗菌性远比对 羟基苯甲酸甲酯强。对抑制细菌，前者所需的浓度为 1000mg/kg，而后者则需用 1000～4000mg/kg。一般来说，革兰氏阳性菌对对-羟基苯甲酸酯的敏感性远高于革兰氏阴性菌[16]。据报道，对 羟基苯甲酸庚酯能有效地抑制 malo 一乳酸菌。在基础液体培养基中，100mg/kg 的对-羟基苯甲酸丙酯可以延缓 A 型肉毒梭状芽孢杆菌孢子的萌发和有毒物质的产生；而 37℃下 200mg/kg 可持续发挥抑制作用达 120h[78]。而

在使用对-羟基苯甲酸甲酯情况下，要达到与对-羟基苯甲酸丙酯相似的抗菌效果，其浓度要达到 1200mg/kg。

对-羟基苯甲酸酯对霉菌的抑制作用要比对酵母的抑制作用强。而对细菌而言，其丙基衍生物最为有效。100mg/kg 或更低浓度的对-羟基苯甲酸丙酯可抑制一些酵母和霉菌，而对-羟基苯甲酸庚酯和对-羟基苯甲酸甲酯分别需 50～200mg/kg 和 500～1000 mg/kg。

与苯甲酸及其钠盐一样，对-羟基苯甲酸甲酯和对-羟基苯甲酸丙酯在食品中的使用量不能超过 0.1%，对-羟基苯甲酸庚酯在啤酒中使用量允许达 12mg/kg，而在果汁和饮料中允许达 20mg/kg。这些化合物的 pK 为 8.47，它们的抗菌活性不像苯甲酸盐那样随着 pH 的降低而提高。据报道，pH 达 8.0 时，它仍具抗菌活力。有关这种防腐剂更详尽的综述可参阅文献 16。

苯甲酸和水杨酸作用方式上的相似性在文献 6 中已有提及[6]。两种化合物被普通变形杆菌等微生物细胞吸收后，能阻碍其葡萄糖和丙酮酸盐氧化成乙酸。对普通变形杆菌，苯甲酸在葡萄糖氧化的最初阶段能提高氧气的消耗速率[6]。和丙酸盐、山梨酸盐一样，苯甲酸盐也是通过抑制底物分子细胞的摄取（cellular uptake of substrate molecules）来达到抑制微生物的目的[31]。芽孢在其萌发阶段对苯甲酸盐最为敏感，见图 13.1。

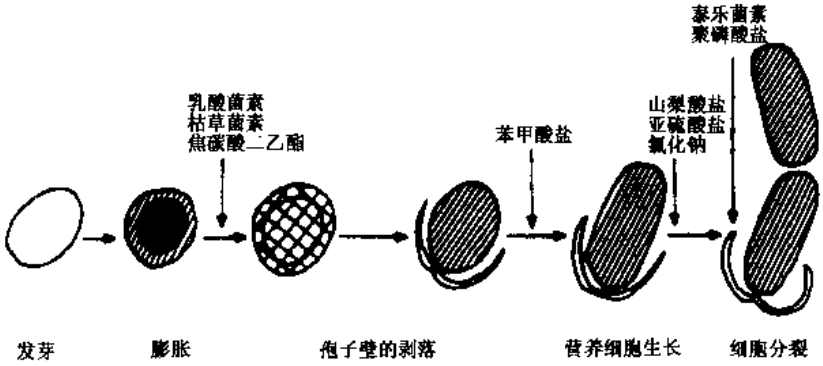


图 13.1 芽孢生长成为营养细胞的过程及一些食品防腐剂在其最小抑制浓度下对此过程起抑制作用的部位

同其它亲脂性化合物，如山梨酸盐和丙酸盐一样，苯甲酸盐处于非解离态才具抗菌活性。在这种状态下，这些化合物在细胞膜中是可溶的，并可作为质子的载体[35]。这样，它们使质子易于进入细胞内，菌细胞为了维持其细胞内正常的 pH，加快了能量的消耗。随着膜活力的破坏，氨基酸的输送受到了不利的影响。

13.2 山梨酸

山梨酸作为食品防腐剂通常以钙盐、钠盐或钾盐形式出现。在食品中其允许的最大使用量是 0.2%。像苯甲酸钠一样，它们在酸性食品中的作用效果要比在中性食品中的好。作为真菌抑制剂，其效果与苯甲酸盐相当。山梨酸作用的最佳 pH 是 6.0 以下，通常

在 pH 大于 6.5 时即无效。在 pH4.0～6.0，山梨酸盐比苯甲酸钠更有效。pH≤3.0 时，山梨酸盐的抗菌性比丙酸盐稍好，但与苯甲酸钠相同。山梨酸盐的 pK 为 4.80，在 pH4.0 时，其 86%是处于非解离状的，然而在 pH6.0 时，只有 6%处于非解离态。在蛋糕中，山梨酸盐的使用量高于丙酸盐，而不会给产品的风味造成影响。

山梨酸盐主要对霉菌和酵母有抑制效果，但研究证实它对许多细菌也有抑制作用。通常过氧化氢酶阳性球菌对其敏感性要高于过氧化氢酶阴性菌，而需氧菌对其敏感性要高于厌氧菌。乳酸菌对山梨酸盐有抵抗性，尤其是在 pH≥4.5 时，这种特性使它可以作为乳酸发酵产品生产中的抗真菌生长剂。山梨酸盐对金黄色葡萄球菌、沙门氏菌、肠细菌、嗜冷腐败菌（尤其是假单胞菌）和副溶血性弧菌都有抑制作用。对副溶血性弧菌，浓度为 30mg/kg 时即有抑制作用。在新鲜家禽肉、真空包装家禽制品、新鲜鱼和水果中使用山梨酸盐都可以延长其货架期。欲了解更多有关情况可见后述的“亚硝酸盐-山梨酸盐混合使用”一节及 Sofos[93]写的综述文章。

许多研究者对肉制品中使用山梨酸盐和亚硝酸盐混合物的抗菌效果作了研究。含 120mg/kg 亚硝酸钠、山梨酸盐的腊肉配方能生产出符合感官质量要求的产品，并可阻止肉毒梭状芽孢杆菌的生长。然而在配方中使用 0.26%山梨酸钾和 40mg/kg 的亚硝盐混合盐时，产品在感观质量或抗肉毒毒素方面并未有明显的差别[46]。1978 年美国农业部提出了使用 40mg/kg 亚硝盐和 0.26%山梨酸钾（同时使用 500mg/kg 抗坏血酸钠或异抗坏血酸钠）混合盐的建议，但一直拖到 1979 年才实施。推迟执行并不是因为山梨酸混合使用后可降低亚硝酸钠用量这一结论有错误，而是因为经感观评定后发现经该方法生产的腊肉有类似化学药品的风味，并产生刺口感[3]。山梨酸盐和降低了用量的亚硝酸盐混合使用已被证实对各种不同的腌制品的防腐是有效的，不但可以抑制肉毒梭状芽孢杆菌，而且可抑制其它诸如金黄色葡萄球菌的生长和梭状芽孢杆菌引起的腐败（厌氧 P.A.3679）。

山梨酸盐最广泛的应用是作为抗真菌剂，使用在诸如奶酪、焙烤制品、果汁、饮料、沙拉调料（dressings）等食品中，作为霉菌抑制剂，其抑制机理可能是对脱氢酶系的抑制。通过对芽孢发芽的抑制，山梨酸盐阻止生长细胞的生成（图 13.1）。

作为亲脂性酸，山梨酸盐、苯甲酸盐和丙酸盐抑制微生物细胞的机理是一样的。其机理涉及质子移动力（PMF）。简要地讲，H^+（质子）和 OH^- 被细胞质膜分离。前者在外，使 pH 上升。而后者在细胞内，使胞内 pH 接近中性左右。由此造成的膜梯度即为电化学势，后者在细胞进行一些诸如氨基酸化合物的主动运输中发挥作用。弱亲脂性酸在此起质子载体作用（protonophores）。在膜上扩散以后，未解离的分子在细胞内电离，并使细胞内 pH 下降。这样导致了转移膜梯度的削弱，从而对氨基酸转运造成不利影响。这种假说在对 P.A.3679 菌的研究中已得到证实：山梨酸盐抑制了 P.A.3679 对苯丙氨酸的摄取，降低了蛋白质的合成速度，改变了核苷酸的积累作用[83,84]。虽然，亲脂性酸对 PMF 的改变作用得到了广泛的认同，但其它因素也会影响它们的作用方式[28]。

关于安全性，山梨酸在体内代谢产生 CO_2 和 H_2O，这与通常存在于食品中的脂肪酸代谢是一致的[21]。

13.3 丙酸盐

丙酸是一种三碳有机酸，其结构是CH_3CH_2COOH。这种酸和它的钙盐或钠盐允许使用在面包、蛋糕、奶酪和其它食品中，主要作为霉菌抑制剂。丙酸也可作为“黏丝病”抑制剂用在面包面团中。这种酸及其盐类解离的速度很慢，因此它们通常被用在低酸食品中。它们对抑制霉菌有较高的专一性，主要用来抑制霉菌而非杀灭霉菌。

丙酸盐的抑菌机理与苯甲酸盐和山梨酸盐一样。其pK是4.87，在pH4.00时，88%的这种化合物处于未解离状态，而在pH6.0，只有6.7%未解离。这种亲油酸的未解离分子才具抗菌活性。丙酸的作用模式已在上面和苯甲酸一起阐述过了。也可参见本部分有关中链脂肪酸和酯类的内容，有关更进一步的内容可参见Doores[23]写的综述文章。

13.4 SO_2和硫酸盐

SO_2和亚硫酸钾、亚硫酸钠、亚硫酸氢钠和亚硫酸氢钾、焦亚硫酸钠和焦亚硫酸钾，其作用方式基本相似，在这里一并叙述。

在干制水果、柠檬汁、糖蜜、葡萄酒、水果汁等食品中，SO_2的使用形式有：气态、液态或一种及多种中性或酸性盐。从古代开始，其原型（parent）化合物已作为一种食品防腐剂。在美国，至少在1813年前，它已作为一种肉类制品的防腐剂。然而，在一些作为维生素B_1供给源的肉类及其它食品中，是不允许使用这类化合物的。虽然SO_2具有抗菌特性，但在某些食品中它也可作为一种抗氧化剂。

亚硫酸在不同的pH下有不同的电离形式，pH<3.0时，主要是形成SO_2，pH在3.0～5.0时形成HSO_3^-，pH>6.0形成SO_3^{2-}[69]。SO_2的pK_a为1.76和7.2。亚硫酸盐可与包括核苷酸、糖、二硫键等其它食品中的成分发生反应。

对微生物作用方面，SO_2在低pH时是醋酸杆菌和乳酸菌的抑菌剂，在果汁和饮料中其有效抑菌浓度为100～200mg/kg。在高浓度下它是一种杀菌剂（bactericidal）。当SO_2来自于焦亚硫酸钠时，在温度不定的肉糜中，为有效地抑制孢子数为100个/g的肉毒梭状芽孢杆菌，SO_2的浓度至少要大于100mg/kg[109]。Banks和Board[2]认为：若焦亚硫酸钠有效SO_2浓度达600mg/kg时，可抑制英格兰鲜香肠中沙门氏菌和其它肠细菌的生长。对SO_2量敏感的8种不同血清型的沙门氏菌，在pH7.0，15～109mg/kg时可被抑制。介凝赛氏杆菌对其最具抗性，在培养中需185～270mg/kg才被抑制。

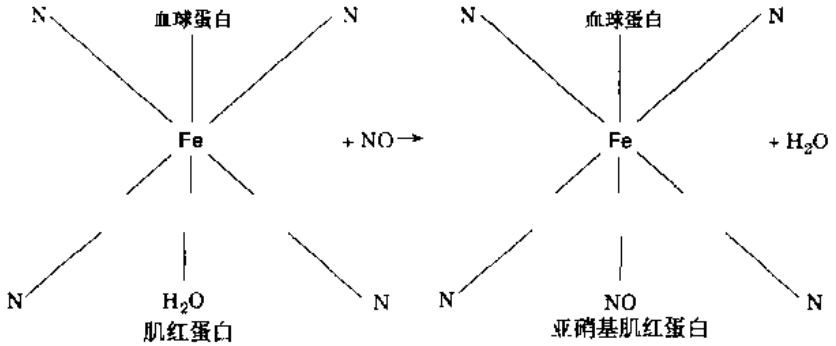
酵母对SO_2的敏感性在乙酸和乳酸菌及霉菌之间，大多数强需氧菌对SO_2的敏感性一般要高于发酵菌。亚硫酸在浓度为0.2～20mg/kg时，对那些包括酵母属、毕赤氏酵母属和假丝酵母属的酵母有抑制作用。然而在某些pH为3.1的水果饮品中，要抑制拜列氏接合酵母，抑制浓度要升至230mg/kg[60]。事实上，酵母在果汁发酵过程中可产生SO_2，一些卡尔斯伯酵母和巴扬氏酵母（*S. bayanus*）形成SO_2的量分别为1000mg/kg和300mg/kg[69]。葡萄上的霉菌，例如葡萄孢属菌可以通过不定时地用SO_2气体吹淋方法来加以控制，而亚硫酸氢盐则可用于破坏黄曲霉毒素[24]。使用亚硫酸盐也可使玉米中黄曲

霉毒素 B_1 和 B_2 含量降低[247]。在水分含量高达 40%的玉米中，亚硫酸氢钠的抗菌作用与丙酸基本相当[55]（在第七部分 27 中将进一步探讨黄曲霉毒素降解问题）。

虽然对 SO_2 发挥作用的确切机理还不清楚，但通过一些实验，提出了几种可能的作用机理。一种解释认为：未解离的亚硫酸或 SO_2 分子具抗菌性，在低 pH 下具有较强的抗菌性的事实可以支持这种观点。Vas 和 Ingram[211]认为：通过添加酸使食品的 pH 下降，再与 SO_2 协同作用可取得更好的保藏效果；另一观点认为：SO_2 的抗菌性是由于其具有强的还原性，可使作用成分的氧气分压降至需氧菌可生长的点位以下，或者 SO_2 可与某些酶系统直接作用。SO_2 也被认为是一种酶抑制剂，可以通过抑制基本酶系来抑制微生物的生长。在干燥食品中，SO_2 抑制酶促褐变的作用就是基于这种假设。因为已知亚硫酸盐对二硫键有破坏作用，因此可认为它能破坏某些特定的基本酶系，由此发生对菌的抑制作用。亚硫酸盐对细胞正常输运（transport）无抑制作用。从图 13.1 可以知道，亚硫酸氢盐对细胞生长过程中的芽孢萌发有抑制作用。

13.5　硝酸盐和亚硝酸盐

硝酸钠和亚硝酸钠常用于腊肉制品的生产，它们的作用有：保持肉的红色、抑制一些腐败产毒菌及有利于风味的形成。有关 NO_2 对腊肉风味影响方面的内容已有专题论述[16,36]。NO_2 在加热和贮存两个过程中可分解。必须指出的是：许多细菌有利用硝酸盐作为电子受体的能力，在此过程中硝酸盐被还原成亚硝酸盐。NO_2 在肉类保藏中具更重要的作用。该离子具较高的反应活性，既可作为还原剂又可作为氧化剂。在酸性条件下电离形成 HNO_2，继而进一步分解产生 NO，NO 是腊肉固色过程中的一个重要反应物。抗坏血酸（维生素 C）和异抗坏血酸也可将 NO_2 还原成为 NO。在还原条件下，NO 和肌红蛋白发生反应形成红色的亚硝基肌红蛋白（也可见表 5.4）。



当肉中色素以氧合肌红蛋白形式存在时，例如在肉糜中，色素先被氧化成正铁肌红蛋白（褐色），后者还原时与 NO 作用生成亚硝基肌红蛋白。因为 NO 有同其它含卟啉的化合物例如：过氧化氢酶、过氧化物酶、细胞色素等相互反应的能力，所以可以设想亚硝酸盐对需氧菌的某些抗菌效果可能来自于此（其机理在下面讨论）。实验证明：在酸性范围内，随着 pH 的下降，NO_2 的抗菌效果增加，在未电离的 HNO_2 中，这种效果也全面增加。

煮熟的腊肉中色素是 dinitrosyl ferrobemochrorne (DNFH)，它是由亚硝基肌红蛋白

中的血红蛋白被第二个 NO 基取代后生成的[89]。一种配方中无亚硝酸盐的牛肉熏香肠已被开发，其配方中加入了 35mg/kg 用牛红血球制备的 DNFH 胶囊，以特丁基对苯二酚(TBHQ)作为抗氧化剂[117]，并加入 3000mg/kg 次磷酸钠作为抗肉毒素剂(antibotulinal)[65,113]。与含亚硝酸盐的对照组相似，用这种配方制成的产品通过 4 个星期的保藏基本上无微生物生长。次磷酸钠是各种作为替代 NO_2^- 化合物中效果最好的一种[2,13]。尽管作出了很大的努力，至今仍未找到[10]能完全取代亚硝酸盐的化合物。

13.5.1 作用的微生物

虽然对于亚硝酸盐抑菌作用考虑最多的是肉毒梭状芽孢杆菌，但对亚硝酸盐作为一种抗菌剂对其它微生物的影响也作了一些评价。20 世纪 40 年代后期对亚硝酸钠作为鱼品防腐剂的效果作了评价，发现在低 pH 范围内有一定的效果。高浓度时，亚硝酸盐对金黄色葡萄球菌有抑制效果，并且随着 pH 的下降其抑制效果也增强。亚硝酸盐对包括沙门氏菌的一些肠道细菌及乳酸菌无抗菌效果，虽然在真空包装的腊肉中有抗菌效果，但这可能是由于亚硝酸盐和其它环境因素共同作用的结果，而不是亚硝酸盐本身作用所致。在某些国家，亚硝酸盐应用于奶酪生产中，以控制酪丁酸梭状芽孢杆菌和丁酸梭状芽孢杆菌引起的产气。它对包括生芽孢梭状芽孢杆菌和产气荚膜梭状芽孢杆菌等其它梭状芽孢杆菌也有抑制效果，而这两种菌常用于实验室研究，作为评估亚硝酸及那些可能作为辅助或活化剂的抗菌物质的潜在抗菌效果的对象菌。

13.5.2 Perigo 因子

腌制、罐装和真空包装的肉类及鱼品几乎不发生肉毒毒素中毒这一事实促使 20 世纪 60 年代中期的一些研究者对“为什么含活芽孢的肉类产品不产生毒素”这一课题进行探索和研究。用培养介质作为研究材料，1967 年有人发现：抑制梭状芽孢杆菌的硝酸盐剂量与其加入的时间次序有关。若要达到同样的抑菌效果，在介质杀菌后加入的硝酸盐剂量要比在杀菌前加入的高约 10 倍。由此认为，在加热过程中介质和亚硝酸盐可能形成某种物质或反应物，使抑菌效果比加热前亚硝酸盐本身具有的抑菌作用提高约 10 倍[71,72]。这种反应物被称为 Perigo 因子。这种作用或因子的存在已被某些人证实，但也被有些人质疑。尽管在腌制的和易腐的腊肉中，这种因子的存在也许是可质疑的，但在包括有亚硝酸盐、铁离子和 -SH 化合物的介质中，抑菌因子的存在是确实可信的[102]。

并非在所有培养介质中都能形成 Perigo 因子，虽然当肉加热至 70℃时，某些活性物质已产生，但加热温度至少达 100℃才可能形成该因子。Perigo 因子可从某些培养介质和肉悬浮液中经渗析得到，但从其它介质中没有找出该因子[51]。在加有亚硝酸盐的同种培养介质中，采用过滤杀菌的介质中也未发现 Perigo 因子的存在[82]。如果将肉加至含有 Perigo 因子的介质中，抑制作用即失去[52]。为此，一些加拿大学者将在肉中形成的抑制剂称为“Perigo 型因子”[11]。

由于亚硝酸盐对加热或烟熏肉制品和鱼类制品有抑菌和抗肉毒毒素的作用，因此亚硝酸盐在这类产品中仍在继续使用。腊肉中亚硝酸盐的抗肉毒毒素作用比发色和形成风味更具公共卫生意义。就形成风味而言，15～50mg/kg 的亚硝酸盐对包括团林根香肠在

内的各种肉制品就足够了[20]。在发酵香肠生产中，100mg/kg 或更高的亚硝酸盐可以形成最佳风味和外观[78]。在培根、碎腌制火腿、罐装午餐肉要达到抗肉毒毒素作用的亚硝酸盐量至少要达 120mg/kg[7,14]。但同时许多这类罐头产品可以降低热处理程度（F_0 为 0.1～0.6）。

13.5.3 腌制成分和其它因素的相互影响

早在 30 年前，Riemann[76]就已注意到热力杀菌腊肉的成分和加工中的各种因素在抗肉毒毒素方面有相互作用的效果。一些非热研究者也提出：在半保藏的肉（指杀菌不足，需低温保藏的）中，腌制盐对热损（heat-injured）孢子的抑制效果比对非热损孢子的抑制效果要好得多[25,81]。单独考虑盐水和 pH 的作用：随着 pH 增加，抑制作用所需的盐浓度要提高。Chang 等人[11]认为：在货架寿命长的罐头肉制品中，盐对热损孢子的抑制作用也许比 Perigo 因子更为重要。在烟熏大麻哈鱼制品中接入 100 个/g 的 A 型和 E 型肉毒梭状芽孢杆菌，并贮存于不透氧的薄膜袋中，浓度为 3.8%和 6.1%的 NaCl 溶液在 7d 贮存期内可分别抑制 E 型和 A 型肉毒梭菌产生毒素[76]。如同时使用 100mg/kg 或更高浓度的 NO_2^-，2.5%浓度的 NaCl 溶液就可抑制 E 型肉毒梭菌毒素的产生，3.5%NaCl 加 150mg/kg $NaNO_2$ 对 A 型肉毒梭菌也同样具抑制作用。对更长的培养时间或更高的孢子接种量，其所需的 NaCl 或 $NaNO_2$ 的用量也要相应提高。

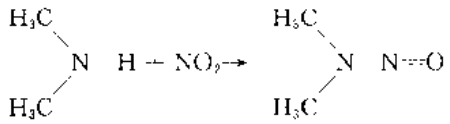
Roberts 等人[79]系统地研究了肉酱中 NaCl、$NaNO_2$、$NaNO_3$、异抗坏血酸、热处理温度、贮存的温度及时间对芽孢生长繁殖的相互作用，他们发现：通过增强上述各种因素可明显降低毒素的产生。不管酸性的提高是来自于外加的酸，还是来自于乳酸细菌，低 pH 对肉毒梭状芽孢杆菌的生长及毒素的产生有拮抗作用已是不争的事实。在添加 0.9% 蔗糖的腊肉中如接种有胚芽乳杆菌，经 4 周贮存，49 个样品中只有 1 个产生毒素。然而加蔗糖而不接种乳酸菌的样品中，经 2 周贮存后，52 个样品中就有 50 个产生毒素[100]。只添加 40mg/kg 亚硝酸盐的样品，2 周后 50 个样品有 47 个产生毒素，但 30 个配方中加有 40mg/kg 亚硝酸盐及 0.9%蔗糖，并接种胚芽乳杆菌的样品，无一产生毒素。虽然这似乎是 pH 直接作用的结果，但其它因素也许也起作用。在以后的研究中，在腊肉的制备过程中加入了 40 或 80mg/kg $NaNO_2$、0.7%蔗糖，并接入乳酸片球菌，将 A 型和 B 型肉毒梭状芽孢菌孢子接入制成的腊肉中，并经真空包装，产品在 27℃下，经过 56d 培养后发现：其抗肉毒毒素产生特性方面要比对照组好得多。对照组腊肉中加入了 120mg/kg 的 $NaNO_2$，但不含蔗糖及乳酸菌[99]。按上述配方制作的腊肉（称为 wisconsin 工艺）经感观评定师评定，其品味优于传统方法制得的腊肉[98]。与传统工艺相似的方面是 wisconsin 工艺中也加入 550mg/kg 抗坏血酸钠或异抗坏血酸钠。

13.5.4 亚硝胺

亚硝酸盐和仲胺发生反应即形成亚硝胺，许多亚硝胺具致癌性。亚硝胺形成的一般方式如下：

$$R_2NH_2 + HONO \xrightarrow{H^+} R_2N{-}NO + H_2O$$

二甲胺和亚硝酸盐反应形成 *N* 亚硝基二甲胺：



除仲胺外，叔胺和季胺类化合物也可在酸性条件下与亚硝基反应生成亚硝胺。在腊肉和鱼品中已发现存在少量的亚硝胺，异抗坏血酸对亚硝胺的形成有抑制作用。

现已证实：乳酸杆菌、肠球菌、梭状芽孢杆菌及一些其它菌在中性 pH 时可促使仲胺和亚硝酸盐进行亚硝基化反应[4,7]。虽然没能分离得到胞外酶，但这种亚硝基化作用在 pH 中性时发生这一事实，使人们认为这种过程是一种酶促反应[4,7]。包括粪肠球菌、粪渣肠球菌在内的一些过氧化氢酶阴性球菌和乳酸乳球菌已证实有形成亚硝胺的能力，但其它试验中乳酸菌和假单胞菌无此作用[15]。这些研究者没能得出有关酶反应的证据。从中国的盐腌海鱼中（先前认为含亚硝胺）分离得到的金黄色葡萄球菌和盐杆菌属菌，将其接种于含有 40mg/kg 硝酸盐和 5mg/kg 亚硝酸盐的咸鱼中，发现有亚硝胺的的形成[20]。

13.5.5 亚硝酸盐-山梨酸盐和其它亚硝酸盐混合物

为了降低腌肉中形成 *N*-亚硝胺带来的潜在危害性，1978 年美国农业部（USDA）首先将腊肉中 NO_2^- 浓度降低至 120mg/kg，并设定其最大亚硝胺含量为 10μg/kg。虽然，120mg/kg 亚硝酸盐加上 550mg/kg 抗坏血酸钠或异抗坏血酸钠足以降低肉毒中毒危害性，但在达到防止肉毒毒素产生这一目的的前提下，尽可能降低硝酸盐含量是非常必要的。为此，1978 年 USDA 提出了允许在腌熏猪肉中添加 40mg/kg 亚硝酸盐和 0.26%山梨酸盐的建议。但一年以后，由于按该配方生产的腊肉在品味上存在一些问题，这一建议被废止。然而，许多研究小组试验后认为：0.26%的山梨酸盐结合使用 40 或 80mg/kg 的亚硝酸盐可有效地防止肉毒毒素的产生。

早期有关 40mg/kg 亚硝酸盐加山梨酸盐对腊肉肉毒毒素产生的抑制和延迟作用的研究中，Ivey 等人[16]在产品中接入 1100 个/gA 型和 B 型孢子肉毒梭状芽孢孢子，并将产品在 27℃下保温，进行为期 110d 的试验。在既无亚硝酸盐，也无山梨酸盐的情况下，出现有毒样品的时间是 19d；在 40mg/kg 亚硝酸盐、无山梨酸盐的情况下，出现有毒样品的时间是 27d；对含 40mg/kg 亚硝酸盐、0.26%山梨酸盐或 0.26%山梨酸盐、不含亚硝酸盐的样品，其产生有毒样品的时间平均超过 110d。亚硝酸盐含量的降低可使熟腊肉中亚硝基吡咯烷含量降低。Sofos 等人（表 13.2）发表了一些不同的结果，认为 80mg/kg 亚硝酸盐才能使样品经 60d 贮存后不产生毒素。除了抑制肉毒梭状芽孢杆菌外，山梨酸盐还可减缓贮存过程中亚硝酸盐的分解、消耗[94]。

异抗坏血酸的作用是通过螯合金属离子从而提高亚硝酸盐的抑制作用，尽管在某些情况下，它可能因提高了残留亚硝酸盐的消耗速度而降低了亚硝酸盐的功效[105,108]。500mg/kg 的 EDTA 在提高亚硝酸盐功效方面似乎比异抗坏血酸更为有效，但有关这方面的研究报道很有限。另一种螯合剂，8-羟基喹啉作为亚硝酸盐增效剂的功效也得到了肯定。在猪肉糜中，200mg/kg 的 8-羟基喹啉加上 40mg/kg 亚硝酸盐，在 27℃下抑制 A 型和 B 型肉毒梭状芽孢杆菌孢子混合液的时间可达 60d[73]。

表 13.2　　亚硝酸盐和山梨酸盐对腊肉产生毒素的影响

（肉毒梭状芽孢杆菌 A 型和 B 型孢子接种于腊肉中，于 27 ℃下贮存 60 d）　　单位：%

处理	产生的毒素量	处　理	产生的毒素量
对照（无 NO_2、无山梨酸盐）	90.0	0.26%山梨酸盐，80mg/kg $NaNO_2$	0.0
0.26%山梨酸盐，无 $NaNO_2$	58.8	无山梨酸盐，120mg/kg $NaNO_2$	0.4
0.26%山梨酸盐，40mg/kg $NaNO_2$	22.0		

在一份有关亚硝酸盐和山梨酸盐相互作用（影响）的评述中证实，混合后的相对有效性取决于腌制盐成分和生产工艺参数。在 pH5.8～6.0 的牛肝培养琼脂中，如加入 1.0%、1.5%或 2.0%山梨酸盐，E 型肉毒梭状芽孢杆菌孢子的萌发率几乎降至零。但在同样浓度下，如 pH 调至 7.0～7.2，则发生异形细胞的萌发和生长[84]。当 500mg/kg 亚硝酸盐加入至含有山梨酸盐的高 pH 介质中时，溶菌作用可以得到加强。这些研究者同时发现，在较高的 pH 下，单独加入 500mg/kg 的亚油酸可防止孢子的产生和生长。在 NaCl 浓度增加或 pH 及贮存温度下降时，山梨酸钾可明显降低猪肉酱中 A 型和 B 型孢子形成毒素的可能性[69]。法兰克福鸡香肠中，在抑制产气荚膜梭状芽孢杆菌生长方面，山梨酸盐-betlaint 混合物与普通亚硝酸盐体系有同样的效果[116]。

13.5.6　作用模式

亚硝酸盐抑制肉毒梭状芽孢杆菌的作用机理可能是：通过干扰铁氧化还原蛋白等一些铁-硫酶系从而阻止从丙酮酸合成 ATP。首先发现这一机理的是 Woods 等人[115]。他们发现：生芽孢梭状芽孢杆菌的磷酸化体系被 NO 抑制，这种情况也同样发生在肉毒梭状芽孢杆菌中，导致代谢过程中丙酮酸的积累[114]。

磷酸裂解反应涉及丙酮酸降解、无机盐和辅酶 A 形成乙酰磷酸。在 ADP 存在下，ATP 由乙酰磷酸和作为另一产物的乙酸盐合成。在丙酮酸降解过程中，电子首先传递至铁氧化还原蛋白，在氢化酶催化的反应中，再从铁氧化还原蛋白传递到 H^+形成 H_2。铁氧化还原蛋白和氢化酶是铁-硫蛋白或酶。

在 Woods 和 Wood 的研究的基础上[114]，Reddy 等人做了一件非常有意义的研究[75]。他们将经过亚硝酸盐-抗坏血酸钠处理的肉毒梭状芽孢杆菌的抽提物在电磁自转共振仪（electron spin resonance）上进行分析，发现 NO 与铁硫化合物反应形成铁-亚硝酰化合物。后者的存在导致了诸如铁氧（化）还（原）蛋白等铁-硫酶系的破坏。

乳酸菌对亚硝酸盐的抵抗作用是众所周知的，但机理直到现在才清楚：这些菌中缺少铁氧还原蛋白。梭状芽孢杆菌中含铁氧还原蛋白和氢化酶，它们在丙酮酸厌氧降解过程中具有电子传递作用产生 ATP、H_2 和 CO_2。梭状芽孢杆菌中的铁氧还原蛋白其相对分子质量为 6000，每摩尔含有 8 个铁原子和 8 个活泼态硫原子。

尽管第一次确切的实验发现报道于 1981 年，但早期的研究已将铁-硫酶系看作可能是亚硝基化合物的作用目标。最早开展这些研究的是 O' Leary 和 Solberg[68]，他们发现：被亚硝酸盐抑制的产气荚膜梭状杆菌的可溶性细胞化合物中自由—SH 基的浓度由原来

的91%下降了。两年以后，Tompkin 等人[107]提出这样的假设：NO 可与肉毒梭状芽孢杆菌生长细胞中的铁离子发生反应，也许就是存在于铁氧还原蛋白中的铁离子。一些学者认为：亚硝酸盐主动传递和电子传递的抑制作用，是与亚硝酸盐对非血红素酶（例如：铁氧还原蛋白和脱氢酶）的抑制作用相一致的[80,116]。螯合剂的存在可以提高抑制作用，其机理可能源自于螯合剂与底物铁的作用：使更多的亚硝酸盐产生 NO，并与微生物反应而变得具有抗菌效果。

13.5.7 有关亚硝酸盐的综述

当亚硝酸盐加至诸如维也纳香肠、腊肉、烟熏鱼和罐藏腊肉等肉制品中，并经杀菌热处理后，不仅确定其具有抗肉毒效果，也可形成所要求的产品色泽和提高腊肉制品的风味。抗肉毒作用包括抑制生长细胞的生长和防止经热处理或烟熏后残存的芽孢萌发和生长。除了肉毒梭状芽孢杆菌外，其它梭状芽孢杆菌也受到相似的作用。然而就发色和风味形成而言，低浓度的亚硝酸盐已足够，但较高浓度的亚硝酸盐对抗菌作用的发挥是必需的。

当亚硝酸盐在特定的实验介质中加热时，可形成一种抗肉毒因子或抑制剂，其确切的构成至今未知。这种抑制因子称为 Perigo 效应（因子）或 Perigo 抑制剂。在膜过滤去菌的介质中不形成 Perigo 因子。只有含有亚硝酸盐的罐藏肉在加热过程中才形成 Perigo 因子。就抗肉毒活性而言，亚硝酸盐的最初浓度比残存浓度更重要。Perigo 因子一旦形成，pH 的改变对其影响不大。

肉制品在加热及贮存过程中，其中的亚硝酸盐含量会有很大程度的降低，且贮存温度越高，其含量的降低程度也越大。

亚硝酸盐的抗肉毒活性与 pH、盐含量、培养温度和肉毒孢子的数量有关。热损伤的芽孢比未受损的芽孢对亚硝酸盐的抑菌作用更敏感。在负 Eh 下的亚硝酸盐抑菌作用比在正 Eh 条件下的更有效。

亚硝酸盐不能降低孢子的热抵抗性。在抗肉毒作用方面，它不受抗坏血酸盐的影响，但在色泽形成方面，抗坏血酸盐可与亚硝酸盐产生协同作用。

乳酸细菌对亚硝酸盐的作用有一定的抗性（见上述）。

芽孢在抗肉毒作用存在时可存活，一旦移至无亚硝酸盐的介质中可以萌发。

亚硝酸盐的 pK 为 3.29。因此，在低 pH 下以未解离的亚硝酸形式存在。pH4.5～5.5 时，亚硝酸处在最大的未解离态且具最大的抗肉毒作用。

有关亚硝酸盐在火腿中的衰减或消失作用，Nordin[65]发现：衰减速度与其浓度成比例，并与温度和 pH 呈指数关系。温度每升高 12.2℃或 pH 每降低 0.86，衰减速度成倍增加，但它不受火腿热变形的影响。除非产品已进行过热处理，否则这些关系不适用于室温条件，因为活的菌体对它的衰减有促进作用。

13.6 食盐和糖

由于食盐和糖在保存食品中具相似的作用模式，所以这些化合物被归于一类。食盐自古即被作为食品防腐剂。早期食品保藏中使用食盐的目的是为了肉品的保藏。这种作

用是基于这样一个事实：在高浓度下，盐对食品和微生物均具脱水作用。当盐水浓度为0.85%～0.90%时，对非海洋微生物产生一个等渗条件。因为此时在细胞膜的两侧，食盐和水的数量相等，水在细胞膜两个方向的流量相等。而当微生物细胞悬浮于5%盐溶液时，膜内侧的水浓度比外侧的要高（水浓度最高时，溶质浓度最低）。通过扩散，水从其高浓度区域流向低浓度区域。在这种情况下，水流出细胞的速度要比它进入的速度快，由此造成细胞的质壁分离，直至导致其生长受抑制甚至可能致死。这便是高浓度的盐加至鲜肉中可以达到保藏目的的基本原理。高盐浓度下，微生物细胞和肉细胞均经历了质壁分离，导致了肉的脱水及微生物细胞生长受抑制或致死。要造成高渗条件必须加入足量的食盐。其浓度越高，保藏和脱水作用越大。在还不具备冷冻条件时，通过盐腌也许是鱼和其它肉类最有效的保藏方法。同其它一些化学保藏剂一样，食盐的抑菌作用不受pH的影响。大多数非海洋菌可在20%或更低的食盐浓度下被抑制，然而一些霉菌通常具有较高的耐渗性。在高浓度的盐中可以生长和需要高浓度盐才能生长良好的微生物称为嗜盐菌；那些在高浓度盐下可以存活，但不能生长的微生物称为耐盐菌（有关盐和亚硝酸盐及其它试剂在抑制肉毒梭状芽孢杆菌中的相互作用已在前面亚硝酸盐一节中讨论）。

糖，例如蔗糖，其保存作用的机理同食盐的基本相同。其主要差异之一在相对使用浓度上。达到同样大小的抑菌作用，蔗糖的用量是食盐用量的约6倍。作为保藏剂，蔗糖最广泛用于水果蜜饯、糖果、炼乳等产品。由于高浓度糖的作用，使某些馅饼、糕点和其它这类产品的货架期大大增长。和盐一样，糖使制品中可被微生物利用的水量明显下降。

各种微生物对糖的高渗的反应是不同的，细菌比酵母、霉菌要敏感，一些酵母和霉菌可以在浓度高达60%的蔗糖液中生存，然而大多数细菌在低于此浓度时早已被抑制。可以生长在高浓度糖液中的微生物被称为嗜高渗菌；那些在高浓度糖中可以生存，但不能生长的菌称为耐高渗菌(osmoduric microorganisms)。一些诸如鲁氏接合酵母(*zygosaccharomyces rouxii*)的嗜高渗菌株可以在极端高浓度的糖液中生长。

13.7 间接抗菌剂

本部分所述添加至食品中的化合物和产品的主要作用不是作为抗菌剂，而是作为一种多功能的食品添加剂。

13.7.1 抗氧化剂

虽然在食品中使用抗氧化剂的主要目的是防止脂肪的自动氧化，但列于表13.3的一些酚类抗氧化剂已被证实对微生物有广谱抑菌作用，包括一些病毒、支原体和原生动物体。这些化合物在加工肉制品中作为亚硝酸盐增效剂（nitrite-sparing）的作用以及与其它抑菌剂的协同抑菌功能已得到广泛的肯定，已发表了一些很好的综述[8,32,53]。

丁基羟基茴香醚（BHA），丁基羟基甲苯（BHT）和持丁基对苯二酚（TBHQ）对革兰氏阳性菌和阴性菌都有抑制作用。根据不同的抗氧化剂品种，在10～1000mg/kg浓度范围内对酵母和霉菌也有抑制作用。总的来说，在食品中要求的抑菌浓度要高于在培养

基中的浓度，尤其在高脂食品中，BHA 在鸡肉酱中抑制芽孢杆菌的功效比在营养性培养液中的低 50 倍[91]。同理，BHA、BHT、TBHQ 和 PG 在肉糜中的抗菌性能也要比在培养基中的差[38]。虽然，在对这些抗氧化剂的敏感性方面，同种细菌的不同菌株也会有很大的不同，但 BHA 和 TBHQ 对细菌和真菌的抑制作用要比 BHT 大得多，而后者具较大的阻止病毒生长的作用。在基础肉汤培养基(prereduced medium)中，50mg/kg 浓度的 BHA 和 200mg/kg 浓度的 BHT 可抑制肉毒梭状芽孢杆菌的生长，而 200mg/kg 的 PG 却无抑菌效果[37]。16 株革兰氏阴性菌和 8 株革兰氏阳性菌在培养基中进行试验，Gailani 和 Fung[35]发现：革兰氏阳性菌对 BHA、BHT、TBHQ 和 PG 的敏感度要远高于革兰氏阴性菌，而每一种抗氧化剂在营养琼脂中的抗菌作用要比在脑心浸出液（BHI）中更高。在营养琼脂中，相对作用效果为 BHA＞PG＞TBHQ＞BHT，而在 BHI 中相对抑菌效果为：TBHQ＞PG＞BHA＞BHT。在 pH4～10 范围内，四种镰刀霉属菌在浓度为 200mg/kg 的 BHA 或对羟基苯甲酸丙酯（PP）的作用下，其分生孢子的萌发受到抑制。但 PP 比 BHA 有更大的抑菌作用。

表 13.3　　一些用于食品中的间接起抗菌性能的化学物质

化合物	主要用途	最敏感的菌种
丁基羟基茴香醚（BHA）	抗氧化剂	细菌，一些真菌
丁基羟基甲苯（BHT）	抗氧化剂	细菌，病毒，真菌
特丁基对苯二酚（TBHQ）	抗氧化剂	细菌，真菌
没食子酸丙脂（PG）	抗氧化剂	细菌
正二氢愈创酸	抗氧化剂	细菌
乙二胺四乙酸（EDTA）	螯合剂/稳定剂	细菌
柠檬酸钠	缓冲剂/螯合剂	细菌
月桂酸	消泡剂	革兰氏阳性细菌
单三月桂酸甘油酯	乳化剂	革兰氏阳性细菌，酵母
丁二酮	风味料	革兰氏阴性细菌，真菌
藏茴香酮	风味料	真菌，革兰氏阳性细菌
苯乙醛	风味料	真菌，革兰氏阳性细菌
薄荷醇	风味料	细菌，真菌
香兰素、乙基香兰素	风味料	真菌
香料/香料油	风味料	细菌，真菌

食物传播的病原菌，例如蜡状芽孢杆菌、副溶血性弧菌、沙门氏菌和金黄色葡萄球菌在浓度低于 500mg/kg 下可被有效地抑制。而一些菌对抗氧化剂敏感，甚至在浓度低于 10mg/kg 时也具有抑制作用。假单胞菌，尤其是绿脓杆菌对抗氧化剂最具抵抗力。在意大利肉肠中加入 BHA 和 TBHQ 结合使用时，当总浓度达 100mg/kg 时，可有效抑制 3 种产毒青霉，但 BHT 和 PG 不具此功效[59]，BHA/山梨酸盐和 BHT/单三月桂酸甘油酯的

组合使用已被证实对金黄色葡萄球菌有协同抑制作用[8,17]，BHA/山梨酸盐可抑制鼠伤害沙门氏菌[17]，BHT/TBHQ 对产黄曲霉毒素的曲霉生长有协同抑制作用[59]。

13.7.2 风味剂

在众多赋予食品以芳香和风味的风味剂中，其中一些具有确定的抗菌效能。总的来说，风味成分的抗真菌性能比抗细菌性要好。不产乳酸的革兰氏阳性细菌对其最为敏感，而乳酸细菌对其有相当大的抵抗力。虽然对芳香化合物更多的研究是在化妆品和香皂的应用方面，但香精油和香料已引起食品微生物学家的高度重视。

在一项研究中，21 个进行实验的风味化合物中，大约有一半其抑制细菌或真菌的最小抑制浓度（MIC）小于或等于 1000mg/kg[56]，pH 对抑制作用有影响，随着 pH 和培养温度的下降，其抑制作用增强，某些此类化合物见表 13.3。

最具抑菌功效的风味剂之一是丁二酮，它赋予制品以奶油芳香味[17]，它具有抑制革兰氏阴性菌和真菌比抑制革兰氏阳性菌更为有效的特点。以 pH6.0 的平板计数琼脂为培养基，培养温度 30℃，300mg/kg 的丁二酮可以抑制 25 株革兰氏阳性菌中的 24 株菌株及 16 株酵母中的 15 株酵母[48]。pH6.0 的营养肉汤培养液中，培养温度为 5℃时，小于 10mg/kg 的丁二酮即可抑制荧光假单胞菌，膝状假单胞菌和粪肠球菌；改变培养温度为 30℃，其它条件同上的情况下，抑制这些和其它菌的浓度约为 240mg/kg[60]。丁二酮似乎可以与革兰氏阴性菌中的精氨酸结合蛋白（arginine-binding）发生反应，从而阻止其对精氨酸的利用。革兰氏阳性菌对其有较大的抵抗性的原因可能是：它们缺乏相似的胞外结合蛋白及它们具有较大的氨基酸池（pool）。另一个赋予制品以奶油芳香味的风味化合物是 2,3 戊二酮，在其浓度为 500mg/kg 或更低的情况下也可以抑制某些特定的革兰氏阳性细菌和真菌[56]。

l-藏茴香酮可赋予食品留兰香味，*d*-藏茴香酮有似藏茴香的芳香味，两者均具抗菌性。*l*-藏茴香酮的抗菌性比 *d* 型异构体的更为有效。在浓度 1000mg/kg 或更低的情况下，两者对真菌的抑制作用要比对细菌的强[56]。苯乙醛具有风信子芳香，在 100mg/kg 下对金黄色葡萄球菌有抑制作用；在 500mg/kg 下，对白色假丝酵母有抑制作用[56,65]，薄荷醇具薄荷的芳香味，实验发现：在 32mg/kg 下可抑制金黄色葡萄球菌，在 500mg/kg 下可抑制埃希氏大肠杆菌和白色假丝酵母的生长[56,65]。香兰素和乙基香兰素在浓度小于 1000mg/kg 下也有抑菌作用，尤其对真菌。

13.7.3 香料和香精油

虽然在食品中使用这些物质的主要目的是作为风味剂和调味剂，但事实上许多香料具有抗菌活性。在所有情况下，抗菌活性来自于特定的化学物质或香精油（在第二部分 3 中有所提及）。20 世纪 70 年代后期对亚硝酸盐替代剂的寻找激发了人们对香料及香料抽取物的兴趣[56]。

预测加入食品中的香料有何种抗菌效果是困难的，食品中采用香料的数量依据风味要求有很大的不同，并且产品成分不同其相对功效也会发生变化。因为不同的香料其抗菌成分的浓度不一，并且许多研究结果报道其用量是以干重计算的。因此，确定一种特

定的香料对某一种菌的最小抑制浓度（MIC）是比较困难的。不同的研究者有不同的实验结果的另一原因是他们采用的分析方法不同。一般来说，对高挥发性化合物进行抗菌性能评价时，在培养介质层表面进行试验与采用倾倒平板和培养液进行试验相比，前者得出的MIC较高。对丁子香酚进行抗菌性评价时，采用在平板计数琼脂（PCA）表面涂布法进行试验时（pH为6），14株革兰氏阴性菌中只有9株，20株革兰氏阳性菌（包括8株乳酸菌）中只有12株在MIC为493mg/kg时被抑制，而在同样pH的营养肉汤中，白色球拟酵母和黑曲霉，金黄色葡萄球菌和大肠杆菌这两组菌的MIC分别只有32mg/kg和63mg/kg[50]。香料抽提物在介质中的抑制作用要比香料低，其原因可能是后者挥发性抑菌成分可以缓慢释放[92]。尽管对各个研究结果进行比较有一定的困难，但香料具抗菌活性这一点是毫无疑问的，许多研究者的试验已表明：至少20种香料或它们的抽提物对抑制大多数引起食物中毒的微生物，包括产真菌毒素的真菌有效[90]。

一般来说，香料在食品中的抑菌效果要比在培养介质中的差。革兰氏阳性菌对香料抑菌作用的敏感性比革兰氏阴性菌高，在革兰氏阳性菌中乳酸菌又最具抗性[11,85]。虽然对此结论有争议，但总体上真菌似乎比革兰氏阴性菌对香料更敏感，而一些革兰氏阴性菌对香料具有很高的敏感性。抗菌成分含量的变化范围从大蒜中蒜素的0.3%～0.5%至丁香中丁子香酚的16%～18%[90]。对敏感性微生物使用香料时，MIC值在1%～5%。多位研究者的实验结果证实：鼠尾草和迷迭香是最具抗菌性的香料。据报道：在培养基中添加0.3%该类香料即可对24株革兰氏阳性菌中的21株有抑制作用，且功效比香辣椒还强[92]。

为研究抽提物和香精油特殊的抑菌效果，Huhtanen[44]制备了33种香料的乙醇抽提液，将它们在培养肉汤中作抑制肉毒梭状芽孢杆菌试验时发现：安娜树和豆蔻树抽取液的MIC为31mg/kg，是33种抽提液中最具抗菌功效的。接下来最具抗菌功效的抽提液是：肉豆蔻、月桂树叶和黑白胡椒抽提液，它们的MIC值为125mg/kg。用oregano油、百里香油和黄樟油进行试验时，Beuchat[54]发现：在液体培养基中100mg/kg对副溶血性弧菌有抑制作用，200～300mg/kg的肉桂油和丁香油、150mg/kg肉桂醛和125mg/kg丁子香酚在液体培养基中可抑制寄生曲霉的生长和黄曲霉毒素的产生[9]。

香料抑制微生物的机理还不清楚，各类不同的香料也许其抑菌机理也不相同。有人推测oregano、迷迭香、鼠尾草和百里香这4种香料的抑菌机理是相似的。因为他们发现，一些乳酸菌如果对一种香料具有抗性的话，那么它同时对其它3种香料也有抗性[7,18]。

13.7.4 中链脂肪酸和酯

乙酸、丙酸和山梨酸是短链脂肪酸，主要用作防腐剂。中链脂肪酸主要用作表面活性剂或乳化剂。肥皂可以很好地帮我们认识中链脂肪酸的抗菌活性，在肥皂中它们以脂肪酸盐的形式存在。最常使用的中链脂肪酸由12～16个碳原子构成。对饱和脂肪酸，最具抗菌性的链长度是C_{12}；单不饱和（含一个双链）脂肪酸中的$C_{16:1}$、多不饱和脂肪酸（含有多于一个双键）中的$C_{18:2}$最具抗菌性[34]。通常，脂肪酸主要对革兰氏阳性细菌和酵母有抑菌功效。链长为C_{12}至C_{16}的脂肪酸对细菌最具抑菌功效，而链长为C_8至C_{12}的脂肪酸对酵母最具抑菌功效[34]。Kabara[33,34]对脂肪酸和酯结构-功能的关系等进行了综

述和讨论。Dymicky 和 Trenchard[26]对饱和脂肪酸对肉毒梭状芽孢杆菌的抑菌功效进行了评述。

单甘油酯和蔗糖二酯比相关的游离脂肪酸更具抗菌性，与作为抗菌剂的山梨酸和对-羟苯甲酸相比，其功效毫不逊色[53]。单三月桂酸甘油酯是单甘油酯中最具抗菌功效的一种；蔗糖二辛酸酯（sucrose dicaprylate）是蔗糖二酯中最具抗菌功效的一种。许多研究者对单三月桂酸甘油酯进行了抗菌性评价，并发现，在 5～100mg/kg 时，其对多种革兰氏阳性菌和一些酵母有抑制作用[16,53]。与短链脂肪酸在低 pH 时更具抗菌功效这一特性不同，单三月桂酸甘油酯在 pH5.0～8.0 时有抗菌功效[36]。因为脂肪酸和酯的有效抑菌范围较窄，并且公认为安全的诸如 EDTA、柠檬酸盐和酚类抗氧化剂等食品添加剂在单独使用时其抗菌作用有限，Kabara[33,34]强调提出了“防腐系统”的概念，即通过几种化学成分的结合使用来控制食品中的微生物，以满足特定食品体系的防腐要求。例如：用这种方法，一个防腐系统可能由单三月桂酸甘油酯、EDTA 和 BHA 组成。虽然，EDTA 自身的抗菌活性较低，但它可破坏革兰氏阴性细菌的细胞外膜结构，从而使菌变得对其它抑菌成分敏感，有助于脂肪酸或脂肪酸酯发挥作用。一种抗氧化剂，例如，BHA 在作为抗氧化剂的同时，又可发挥其抑制细菌和霉菌的功效。通过使用这样一种系统，抵抗型菌株的生长可减少至最小程度，相对于抑制系统的功效而言，食品的 pH 也变得不那么重要。

13.8 乙酸和乳酸

作为防腐剂，乙酸和乳酸是最广泛使用的两种有机酸。在许多情况下，食品中的这两种酸是由于乳酸菌在食品中生长、发酵产生的。诸如腌菜、泡菜和酸奶这些产品的生产是通过各种乳酸菌的发酵作用完成的。在此作用过程中，也会产生乙酸、乳酸和其它酸。

丙酸和乳酸等有机酸具抗菌功效是因为它们可以降低产品的 pH，直至腐败菌不能生长。另一方面，未解离的酸分子起代谢抑制作用。为检测食品中的有机酸的含量，用滴定酸度比单独使用 pH 更有价值，因为后者只是测定电离氢离子的浓度，而有机酸不能完全电离。在测定滴定酸度时，可通过测定与已知数量的碱反应的能力来标定酸的数量。泡菜等产品的滴定酸度比 pH 更能真实反映产品中存在的酸的数量。

乙酸的杀菌功效可以通过它对某些特定病原菌的作用得以证实。两种沙门氏菌加入以油和醋为基质的沙拉酱中，最初菌量为 5×10^6 的肠炎沙门氏菌在 5min 后已无法检出。同样，10min 后鼠伤寒沙门氏菌也无法再检出[63]。

有机酸也用于清洗和消毒屠宰后的动物胴体，以降低病原菌的数量，增长产品的货架期，有关这一话题在第三部分 4 中进行讨论。

13.9 抗生素

抗生素是微生物的次级代谢产物，它们可以抑制或杀死广谱的其它微生物。大多数使用的抗生素是由霉菌和链球菌属细菌产生的。一些类抗生素的物质是由芽孢杆菌生产

的，但至少一种。乳酸链球菌肽是一些乳酸链球菌菌株产生的。虽然乳酸链球菌素是一种 Lanxibiotic（含稀有氨基酸、内消旋羊毛硫氨酸及 3-甲基羊毛硫氨酸），但人们更多地认为它是一种细菌素（见第二部分 3）。在四大类细菌素中，它属于第 I 类。与抗生素一样，细菌素也是由微生物产生的化学化合物，具有抑制和杀死其它微生物的功能，但与抗生素不同，它们通常只抑制或杀死与它们密切相关的菌种或同一菌种中的不同菌株。细菌素和类细菌素已在第二部分 3 中乳的拮抗作用中讨论。在这一部分，将对乳酸链球菌素和枯草菌素作为抗生素进行讨论。

在许多国家，乳酸链球菌素和纳它霉素（natamycin）这两类抗生素是允许在食品中使用的，其它三类（四环素、枯草菌素和泰乐菌素）已着手进行研究，并发现在各种食品中使用时有一定效果。

枯草菌素、泰乐菌素和乳酸链球菌素这三类抗生素在罐头食品中作为热力辅助剂（可降低热力杀菌强度）的功能已进行了广泛的研究。然而乳酸链球菌素在奶酪中的应用最为广泛。对氯四环素（chlotetracycline）和羟基四环素（cxytetracycline）在新鲜食品中的应用进行了广泛的研究，纳它霉素可作为食品的抗真菌剂。

一般来说，许多消费者并不欢迎使用化学防腐剂的食品，在食品中使用抗生素更不受欢迎。使用任何食品添加剂都可能带来一些危害性，但其危害性一般小于其带来的益处。而在美国，通常的观点是：在食品中使用抗生素带来的益处不会超过其危害性，这结果有的已公认，有的是推测而来的。Ingram 等人提出了将抗生素作为食品防腐剂应注意的 15 条意见，其中关键的几条如下：

①抗生素必须杀死，而不仅是抑制菌群，并可理想地降解成无害的物质，对那些需蒸煮的食品，在蒸煮过程中它可以被分解；

②抗生素不能因食品成分或微生物代谢产物而失活；

③抗生素不会轻易刺激产生抵抗型菌株；

④用于治疗或作为动物饲料添加剂的抗生素，不能用于食品中。

四环素既用于临床治疗又作为饲料添加剂，泰乐菌素用于动物饲料并可治疗一些家禽的疾病（表 13.4）。乳酸链球菌素和枯草菌素既不用于药品，也不用于动物饲料中。乳酸链球菌素已在许多国家使用，而枯草菌素并非如此。这两类抗生素结构上的相似之处见表 13.2。

表 13.4　　一些抗生素的性质

特性	四环素	枯草菌素	泰乐菌素	乳酸链球菌素	纳它霉素
食品中使用的广泛性	不是	不是	不是	是	是
第一次在食品中使用	1950 年	1950 年	1961 年	1951 年	1956 年
化学性质	四环素	多肽	大环内脂	多肽	多烯
作为热力杀菌辅助剂	不是	是	是	是	不是
热稳定性	敏感	稳定	稳定	稳定	稳定

续表

特性	四环素	枯草菌素	杀乐菌素	乳酸链球菌素	纳它霉素
微生物谱	G（+），G（-）	G（-）	G（-）	G（+）	真菌
医药上使用情况	是	不是	是[a]	不是	是[b]
饲料中使用情况	是	不是	是	不是	不是

[a] 在治疗家禽疾病中使用；

[b] 有限的。

13.9.1 乳酸链球菌素

乳酸链球菌素是一种结构上类似于枯草菌素的多肽物质，而与枯草菌素不同的是，它不含色氨酸残基（图 13.2）。它们的 C-端氨基酸构成是相似的，N-端则不同。乳酸链球菌素在食品中的首次使用是由 Hirsch 等人[237]进行的。目的在于防止由丁酸梭状芽孢杆菌引起的瑞士奶酪的腐败。大约 50 个国家在不同程度上允许其用于食品，很显然它是食品防腐中最常用的一种抗生素[238]。

作为食品防腐剂，乳酸链球菌素的一些理想特性如下：

①无毒；

②由乳酸链球菌自然产生；

③具有热稳定性和极好的贮存稳定性；

④可以被消化酶分解；

⑤没有异常风味或气味；

⑥抗菌活性范围窄。

乳酸链球菌素对革兰氏阳性菌，尤其是形成芽孢的 G（+）菌有效。但对革兰氏阴性菌和真菌无抑菌性，而粪肠球菌是革兰氏阳性菌中对其最具抗性的菌之一。

有关乳酸链球菌素在罐头食品中作为热力杀菌辅助剂或作为芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌热休克孢子（heat-shocked spores）抑制剂已进行了许多研究，其阻止萌发孢子生长的 MIC 范围从 3 至大于 5 000IU/mL 或<1 至>125mg/kg（1μg 纯乳酸链球菌素大约是 40IU）[239]。虽然有的国家对其无使用浓度的限制，但根据国家和食品的不同，通常使用的剂量范围在 2.5～100mg/kg。

为使肉毒梭状芽孢杆菌和腐败细菌的芽孢失活，低酸性罐头食品常规的热处理过程中 F_0 需达到 6～8（见第五部分 16）。通过加入乳酸链球菌素，热处理过程的 F_0 可降至 3.0（同样可使肉毒梭状芽孢杆菌芽孢失活），由此可提高低酸性罐头食品的质量。尽管低热处理不能破坏腐败微生物的孢子，但乳酸链球菌素可以作用于孢子萌发的前期过程，从而阻止它们的生长（图 13.1）。除了在一些罐头食品中使用外，乳酸链球菌素广泛应用于乳制品中，如加工干酪、炼乳、巴氏消毒乳等。一些国家也允许在西红柿制品和果蔬罐头中使用乳酸链球菌素[240]，在酸性食品中它最稳定。

鉴于乳酸链球菌素在抑制肉毒梭状芽孢杆菌芽发孢子生长上的有效性和人们对寻找一种可以在肉制品中替代亚硝酸盐的安全性物质的要求，对它作为亚硝酸盐替代品的可

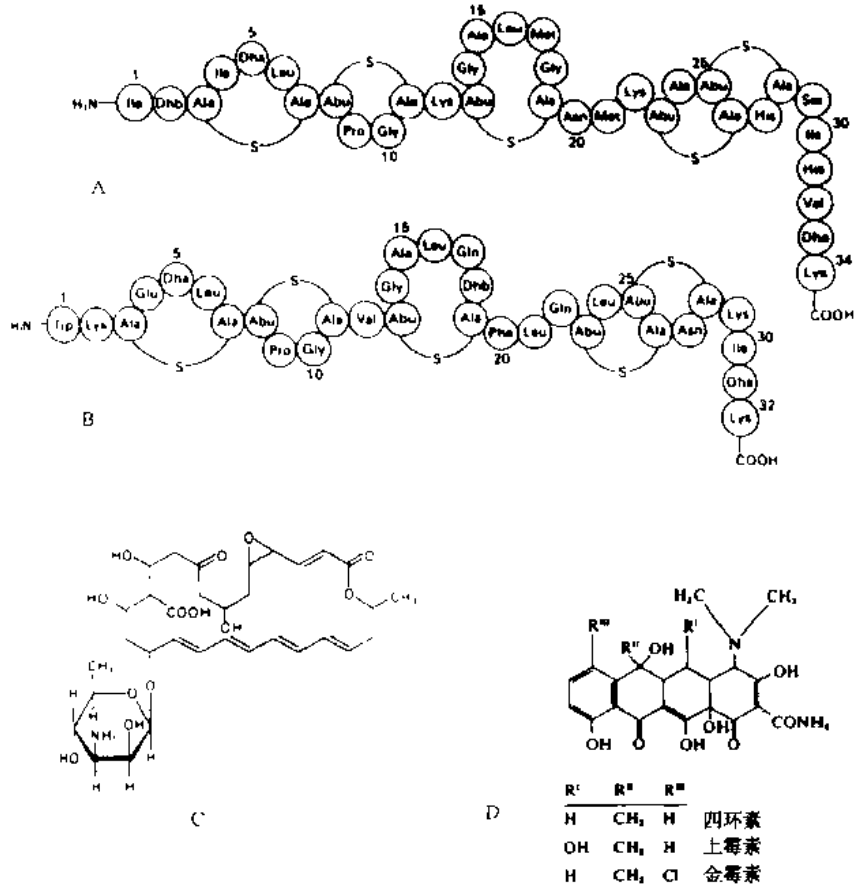


图 13.2 乳酸链球菌素（A）、枯草菌素（B）、纳它霉素（C）和四环素（D）的结构式

能性已进行了研究。虽然一些以生芽孢梭状芽孢杆菌及其它非病原性微生物为试验对象的研究取得了令人鼓舞的结果，但对一项含有 A 型和 B 型肉毒梭状芽孢杆菌孢子的肉浆所做的研究表明：即使乳酸链球菌素的浓度达 550mg/kg，并与 60mg/kg 亚硝酸盐结合使用，还不能抑制这些孢子的生长[234]。在无亚硝酸盐的培养介质中，达到 50%抑制率所需的乳酸链球菌素量，对 E 型肉毒梭状芽孢菌孢子为 1～2mg/kg，B 型为 10～20mg/kg，A 型为 20～40mg/kg[87]。后来发现在熟肉介质中起抑制作用的浓度要比在 TPYG 介质中的高，并且认为乳酸链球菌素在抑制肉毒梭状芽孢杆菌孢子生长方面与亚硝酸盐的功效大体一致。

关于其作用的机理，乳酸链球菌素和枯草菌素似乎是一致的。乳酸链球菌素、枯草菌素和其它抗生素的结构基因似乎是相同的。这些抗生素作用于细胞的部位是细胞质膜，在此它们通过去极作用使细菌膜激活（降低横跨膜的电势），并形成与电压关联的多态孔（multistate pores）[21,85]。孔的形成的结果是积累的氨基酸的流失和氨基酸转移的受阻。单核细胞增生李斯特菌的一株乳酸链球菌素-抗突变型菌株的膜中磷脂含量较少[234]，假设乳酸链球菌素作用的膜目标是磷脂，较少的磷脂量可使膜形成孔的可能性下降[64]。

13.9.2 纳它霉素

这种抗生素（也被称为 pimaricin tennecetin 和 myprozine）是一种多烯化合物。它对

酵母和霉菌特别有效，但对细菌无效。纳它霉素是一种非国际性专利名称，因为它是从纳它亚链霉素中分离得到而命名。它的结构式列于图 13.2。

准许纳它霉素成为食品防腐剂，FAO 和 WHO 专家委员会是基于下述考虑的：它不作用于细菌，在真菌中对它有抵抗性的菌比例相当低，在其它抗真菌多烯化合物中它很少涉及交叉抵抗，真菌间的 DNA 转移没有达到一些细菌的程度。同时，从表 13.4 可知，它作为临床药剂的使用是有限的，并且它不作为饲料添加剂使用。许多研究实验结果已表明，它对酵母和霉菌都有抑制效果，对许多这方面的报道已作了综述[45]。

Klis 等人[57]将纳它霉素和山梨酸及 4 种其它抗真菌抗生素的相对抑菌效果进行了比较。为了抑制 16 株不同的真菌（大多数是霉菌），100～1000mg/kg 山梨酸是必需的，但纳它霉素在同样的介质中，对相同菌株起抑制作用的浓度只需 1～25mg/kg。为了控制草莓和树莓上的真菌，将纳它霉素和龟裂霉素、制霉菌素的抑菌性能进行了比较：纳它霉素和龟裂霉素一样在 10～20mg/kg 浓度下可有效抑菌，但制霉菌素的有效抑菌浓度需 50mg/kg。为控制意大利腊肠上的真菌，一组研究者发现：在新鲜意大利腊肠上喷涂 0.25%纳它霉素溶液是有效的[42]。但另一研究者在将意大利干香肠浸于 2000mg/kg 纳它霉素溶液中，试图阻止其表面霉菌生长，但结果却不理想[43]。纳它霉素喷涂（2×1000mg/kg）的抑菌效果与 2.5%山梨酸钾的相同或比后者稍好。

纳它霉素同其它多烯类抗生素的作用机理似乎相同：与膜中固醇结合，导致选择性膜渗透性的畸变（distortion）[38]。因为细菌膜中不具有固醇，它们对这类抗生素缺乏敏感性的机理即在于此。

13.9.3 四环素

氯四环素（CTC）和羟基四环素（OTC）分别在 1955 年和 1956 年被美国 FDA 批准使用，7mg/kg 浓度用于控制生的冷藏家禽的细菌性腐败，但随即便禁止使用。这组抗生素在延长冷藏食品的货架期的功效首次由 Tarr 确认，并在加拿大对鱼进行了相关的研究[101]。接下来许多国家的大批研究者确认 CTC 和 OTC 不但在鱼和海产品中，而且在家禽、红色肉、蔬菜、原料乳及其它食品中都有抗菌功效（食品中应用方面的综述，见参考文献 49），CTC 通常比 OTC 更有效。冷藏肉用 7～10mg/kg 液进行表面处理，通常至少可以延长 3～5d 货架期，并使最终腐败菌相由原来的革兰氏阴性菌向酵母和霉菌转移。在 CTC 与山梨酸盐结合使用以延缓鱼腐败过程中，混合物的作用效果可持续 14d。经过在 5mg/kgCTC 和 1%山梨酸盐液浸泡的石鱼（Rockfish）鱼片，经真空包装后在 2℃下贮存 14d 后其需氧平板菌数（APCs）比对照组要低得多[62]。

四环素的对热敏感性及在食品贮存过程中易变性是最初将其作为食品添加剂的重要因素。它在治疗人类及动物疾病中常被使用，也用于饲料添加剂中。在发达国家中将其作为食品防腐剂，很显然它带来的危害是大于带来的益处的。

13.9.4 枯草菌素

枯草菌素这种抗生素是由美国农业部西区实验室的科学家发现和研制的，Dimick 等人[22]对其性质进行了描述[22]。它的结构与乳酸链球菌素相似（图 13.2）。虽然它产自于

枯草芽孢杆菌的一些菌株，但如乳酸链球菌素一样，它对革兰氏阳性菌有抑制功效。它在酸中是稳定的，并具有很高的热稳定性，经得起121℃下30～60min的热处理。5～20mg/kg的枯草菌素在罐头食品中可有效地抑制萌发芽孢的生长，它的作用位置同乳酸链球菌素（图13.1）。与乳酸链球菌素一样，它既不用于治疗人类和动物的感染，也不作为饲料添加剂。虽然自20世纪50年代后期以来它并未受到足够的重视，但它的抗菌功效却可与乳酸链球菌素媲美。它的作用模式已与乳酸链球菌素一起作了介绍，有关它的发展及作用评价也作了综述[10]。

13.9.5 泰乐菌素

泰乐菌素这种抗生素如临床使用的红霉素、deandomycin等抗生素一样是非多烯大环内酯化合物。它比乳酸链球菌素和枯草菌素更具抗菌性能。Denny等人[19]率先对其在罐头食品中应用的可能性进行了研究。当1mg/kg泰乐菌素加入至含平酸孢子的乳剂型玉米中，并加入“肉毒”成分，在54℃下培养30d后，产品不发生腐败[19]。有关综述[4,9]介绍了20世纪60年代其他学者发现的一些类似的结果。

与乳酸链球菌素、枯草菌素和纳它霉素不一样，泰乐菌素用于动物饲料，也用于治疗家禽的某些疾病。作为大环内酯化合物，它对革兰氏阳性细菌最为有效。它通过与50S核蛋白体亚单位结合，从而抑制蛋白质的合成，它与红霉素至少有部分的交叉抵抗作用。

13.10 水果的抗真菌剂

列于表13.5的一些化合物可用于控制采摘后水果的真菌，主要是霉菌的腐败。Benomyl的使用方法是均匀涂布于整个水果的表面。其使用的浓度是0.5～1.0g/L。它可以透过一些植物的表面，常被用于控制香蕉的冠顶腐烂（crown rat）和炭疽病及柑橘类水果的茎端腐烂。它的作用效果比thiabendazole还要好，且具有易穿透的优点。Benomyl和thiabendazole都对控制镰刀霉菌引起的干烂有效。为了阻止灰霉病（Botrytis）在葡萄间的扩散，SO_2被用于葡萄长期的贮存过程中。采摘后不久使用SO_2进行处理，此后大约一星期处理一次。最初处理通常用1%的SO_2制品进行20min处理，随后处理的浓度为0.25%（SO_2在其它食品中的应用在前已讨论）。

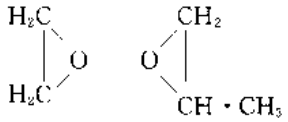
表13.5 一些用于控制新鲜水果真菌腐烂的化学试剂

化合物	水果
Thiabendazole	苹果、梨、柑橘类、菠萝
Benomyl	菠萝、苹果、梨、香蕉、柑橘类、芒果、番木瓜、桃、樱桃
联二苯	柑橘类
SO_2（蒸熏）	葡萄
α-联苯酚钠盐	苹果、李、柑橘类、菠萝

木霉的抽提物（6-戊基-2-吡喃酮，6-PAP）是一种灰霉病菌和破坏新西兰猕猴桃的密环菌（*Armillaria*）的有效抑制剂。6-PAP 在抑制其它真菌上的有效性还不清楚。

13.11　乙烯和丙烯氧化物

由于乙烯和丙烯氧化物具有相似的功能，本部分将乙烯和丙烯氧化物及乙酯和甲酯一起介绍。氧化物的结构如下：



氧化物以气体形式存在，在食品工业中作为抗真菌剂。这些氧化物在干果、坚果、香料等中使用，主要是作为一种抗真菌物质。

乙烯氧化物是一种烷化剂，推测其抗菌活性与这种作用有关，并按下列方式进行。在有活泼氢原子存在的情况下，不稳定的乙烯氧化物的三键被打开。氢原子和氧结合形成羟乙基残基，CH_2CH_2OH，后者与脱氢后的有机分子在脱去氢的位置上进行结合。羟乙基基团阻碍了微生物蛋白质的活性基团，从而起抑制作用。有能力提供活泼态氢的基团有：—COOH、$—NH_2$、—SH 和—OH。乙烯氧化物似乎是通过孢子 DNA 中鸟嘌呤和腺嘌呤的烷基化作用来对肉毒梭状芽孢杆菌的孢子产生作用[61,112]。

乙烯氧化物作为气态杀菌剂，在食品无菌包装中可对柔性和半刚性包装容器进行杀菌。它们通过处理室空间后可将容器中的所有气体驱除。关于它对微生物的作用，对生长细胞的功效要比对芽孢的作用强得多，这点可从表 13.6 中所给的 D 值中看出。

表 13.6　　一些食物传播的微生物对 4 种化学杀菌剂的 D 值

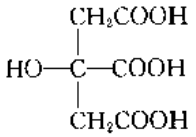
微生物	D^a	浓度	温度/℃	条件	参考文献
过氧化氢					
肉毒梭状芽孢杆菌 169B	0.03	35%	88		103
凝结芽孢杆菌	1.8	26%	25		104
嗜热脂肪芽孢杆菌	1.5	26%	25		104
枯草芽孢杆菌 ATCC95244	1.5	20%	25		97
枯草芽孢杆菌 A	7.3	26%	25		103
乙烯氧化物					
肉毒梭状芽孢杆菌 62A	11.5	700mg/L	40	47%R.H.	86
肉毒梭状芽孢杆菌 62A	7.4	700mg/L	40	23%R.H.	112
生芽孢梭状芽孢杆菌 ATCC7955	3.25	500mg/L	54.4	40%R.H.	56
凝结芽孢杆菌	7.0	700mg/L	40	33%R.H.	5
凝结芽孢杆菌	3.07	700mg/L	60	33%R.H.	5

续表

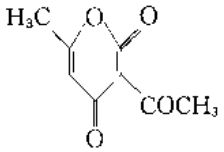
微生物	D^a	浓度	温度/℃	条件	参考文献
嗜热脂肪芽孢杆菌 ATCC7953	2.63	500mg/L	54.4	40%R.H	56
短乳杆菌	5.88	700mg/L	30	33%R.H	5
D. radiodurams	3.00	500mg/L	54.4	40%R.H	56
次氯酸钠					
黑曲霉分生孢子	0.61	20mg/kg[c]	20	pH3.0	12
黑曲霉分生孢子	1.04	20mg/kg[c]	20	pH5.0	12
黑曲霉分生孢子	1.31	20mg/kg[c]	20	pH7.0	12
碘（1/2 I_2）					
黑曲霉分生孢子	0.86	20mg/kg[c]	20	pH3.0	12
黑曲霉分生孢子	1.15	20mg/kg[c]	20	pH5.0	12
黑曲霉分生孢子	2.04	20mg/kg[c]	20	pH7.0	12

[a] 以 min 计；[b] C；[c] 以氯计。

13.12 其它各种化学防腐剂

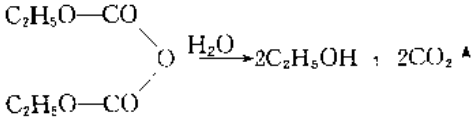


二乙酸钠（$CH_3COONa \cdot CH_3COOH \cdot H_2O$），乙酸的衍生物，被用于面包和糕点中以防止霉变。有机酸例如柠檬酸在软饮料等食品中具防腐作用。过氧化氢（H_2O_2）作为食品防腐剂的使用是有限的。H_2O_2 与热力杀菌结合，已被用于牛乳的巴氏杀菌和糖的加工，但它最广泛的用途是作为杀菌剂，在无菌包装系统中对与食品接触的烯多聚物和聚乙烯表面进行杀菌（见第五部分 16）。一些食物传播的微生物的 D 值在表 13.6 中列出。乙醇（C_2H_5OH）用于风味物的抽提，由于它的脱水和变性特性也可发挥防腐作用。脱水乙酸，可用于保藏南瓜。焦碳酸二乙酯作为一种酵母抑制剂，已被用于瓶装葡萄酒和软饮料。水解或醇解可使它分解产生 CO_2 和乙醇。

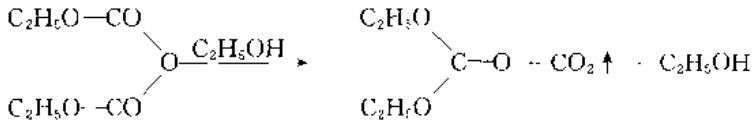


脱水乙酸

水解（与水反应）



醇解（与乙醇反应）



啤酒酵母、黑曲霉和纯黄丝衣霉的分生孢子暴露在这种化合物中的最初 30min 即可被杀灭，而对纯黄丝衣霉的子囊孢子，最大量的杀灭需要 4～6h[196]。根据种或株的不同，它对酵母的致死浓度在 20～1000mg/kg，杀灭植质乳杆菌和肠膜状明串珠菌的时间为 24h 或更长。形成芽孢的细菌对其有很高的抵抗性。有时在使用该化合物时会产生尿烷，由于它是一种致癌物质，所以在美国已不再允许使用焦碳酸二乙酯。

木烟（wood smeka）可赋以烟熏食品特定的化学物质，使这些产品具抵抗微生物腐败的能力。其中最重要的一种成分是甲醛，它的抗菌特性已被人们认识多年了。通过与氨基的反应，木烟可作为一种蛋白质变性剂。同时木烟也含有脂肪酸、乙醇、甲酮、苯酚、大量的乙醛、焦油、甲酚、甲醇和其它化合物，所有这些成分均使烟熏肉具抗菌作用。由于产生烟雾需要一定的热量，因此，烟熏产品的部分货架稳定性来自于热对表面微生物的杀灭作用。干燥过程也有此作用。Handford 和 Gibbs[39]对烟熏液抗菌活性的研究表明：使产品产生认可的烟熏风味的烟浓度只有很小的（几乎无）抗菌活性。用含 1∶1 稀释的烟熏液的琼脂培养基进行试验时，发现对微球菌和葡萄球菌的抑菌效果比对乳酸菌的稍好一些。烟熏和真空包装的综合效果使烟熏产品中过氧化氢酶阳性的细菌数下降，而对氧化氢酶阴性的乳酸菌在真空包装产品的低 Eh 条件下具有较强的抵抗力。

葡萄糖氧化酶催化葡萄糖的氧化，在 O_2 存在的条件下，使其产生葡萄糖酸和过氧化氢。这种酶是由某些霉菌产生的，其反应产物已证实：至少对一些培养基上培养的革兰氏阴性细菌的生长有抑制作用。

参 考 文 献

[1] Abee, T. 1995. Pore forming bacteriocins of Gram positive bacteria and self-protection mechanisms of producer organisms. *FEMS Microbiol. Lett.* 129: 1～10

[2] Banks, J. G., and R. G. Board. 1982. Sulfite inhibition of *Enterobacteriacae* including *Salmonella* in British fresh sausage and in culture systems. *J. Food Protect.* 45: 1292～1297, 1301.

[3] Berry, B. W., and T. N. Blumer. 1981. Sensory, physical, and cooking characteristics of bacon processed with varying levels of sodium nitrite and potassium sorbate. *J. Food. Sci.* 46: 321～327.

[4] Beuchat, L. R. 1976. Sensitivity of *Vibrio parahaemolyticus* to spices and organic acids. *J. Food Sci.* 41: 899～902.

[5] Blake, D. F., and C. R. Stumbo. 1970. Ethylene oxide resistance of microorganisms important in spoilage of acid and high-acid foods. *J. Food Sci.* 35: 26～29.

[6] Bosund, I. 1962. The action of benzoic and salicylic acids on the metabolism of microorganisms. *Adv. Food Res.* 11: 331～353.

[7] Bowen, V. G., and R. H. Deibel. 1974. Effects of nitrite and ascorbate on botulinal toxin formation

in wieners and bacon. In *Proceedings of the Meat Industry Research Conference*, 63～68. Chicago: American Meat Institute Foundation.

[8] Branen, A. L., P. M. Davidson, and B. Katz. 1980. Antimicrobial properties of phenolic antioxidants and lipids. *Food Technol.* 34 (5): 42～53, 63.

[9] Bullerman, L. B., F. Y. Lieu, and S. A. Seier. 1977. Inhibition of growth and aflatoxin production by cinnamon and clove oils, cinnamic aldehyde and eugenol. *J. Food Sci.* 42: 1107～1109, 1116.

[10] Cassens, R. G. 1995. Use of sodium nitrite in cured meats today. *Food Technol.* 49 (7): 72～80, 115.

[11] Chang, P. -C., S. M. Akhtar, T. Burke, and H. Pivnick. 1974. Effect of sodium nitrite on *Clostridium botulinum* in canned luncheon meat: Evidence for a Perigo-type factor in the absence of nitrite. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 7: 209～212.

[12] Cheng, M. K. C., and R. E. Levin. 1970. Chemical destruction of *Aspergillus niger* conidiospores. *J. Food Sci.* 35: 62～66.

[13] Christiansen, L. N., R. W. Johnston, D. A, Kautter, J. W. Howard, and W. J. Aunan. 1973. Effect of nitrite and nitrate on toxin production by *Clostridium botulinum* and on nitrosamine formation in perishable canned communited cured meat. *Appl. Microbiol.* 25: 357～362.

[14] Christiansen, L. N., R. B. Tompkin, A. B. Shaparis, T. V. Kueper, R. W. Johnston, D. A. Kautter, and O. J. Kolari. 1974 Effect of sodium nitrite on toxin production by *Clostridium botulinum* in bacon. *Appl. Microbiol.* 27: 733～737

[15] Collins-Thompson, D. L., N. P. Sen, B. Aris, and L. Schwinghamer. 1972. Nonenzymic in vitro formation of nitrosamines by bacteria isolated from meat products. *Can. J. Microbiol.* 18: 1968～1971.

[16] Davidson, P. M. 1983. Phenolic compounds. In *Antimicrobials in Foods*, ed. A. L. Branen and P. M. Davidson, 37～73. New York: Marcel Dekker.

[17] Davidson, P. M., C. J. Brekke, and A. L. Branen. 1981, Antimicrobial activity of butylated hydroxyanisole, tertiary butylhydroquinone, and potassium sorbate in combination. *J. Food Sci.* 16: 314～316.

[18] Delves-Broughton, J. 1990. Nisin and its uses as a food preservative. *Food Technol.* 44 (11): 100, 102, 104, 106, 108, 111～112, 117.

[19] Denny, C. B., L. E. Sharpe, and C. W. Bohrer. 1961. Effects of tylosin and nisin on canned food spoilage bacteria. *Appl. Microbiol.* 9: 108～110.

[20] Dethmers, A. E., H. Rock, T. Fazio, and R. W. Johnston. 1975. Effect of added sodium nitrite and sodium nitrate on sensory quality and nitrosamine formation in thuringer sausage. *J. Food Sci.* 40: 191～195.

[21] Deuel, H. J., Jr., C. E. Calbert, L. Anisfeld, H. Mckeehan, and H. D. Blunden. 1954. Sorbic acid as a fungistatic agent for foods. II. Metabolism of α,β-unsaturated fatty acids with emphasis on sorbic acid. *Food Res.* 19: 13～19.

[22] Dimick, K. P., G. Alderton, J. C. Lewis, H. D. Lightbody, and H. L. Fevold 1947. Purification and properties of subtilin. *Arch. Biochem.* 15: 1～11

[23] Doores, S. 1983. Organic acids. In *Antimicrobials in Foods*, ed. A. L. Branen and P. M. Davidson, 75～107. New York: Marcel Dekker.

[24] Doyle, M. P., and E. H. Marth. 1978. Bisulfite degrades aflatoxins. Effect of temperature and

concentration of bisulfite. *J. Food Protect.* 41: 774～780.

[25] Duncan, C. L., and E. M. Foster. 1968. Role of curing agents in the preservation of shelfstable canned meat products. *Appl. Microbiol.* 16: 401～405.

[26] Dymicky, M., and H. Trenchard. 1982. Inhibition of *Clostridium botulinum* 62A by saturated *n*-aliphatic acids, *n*-alkyl formates, acetates, propionates and butyrates. *J. Food protect.* 45: 1117～1119.

[27] Eckert, J. W. 1979. Fungicidal and fungistatic agents: Control of pathogenic microorganisms on fresh fruits and vegetables after harvest. In. *Food Mycology*, ed. M. E. Rhodes, 164～199. Boston: Hall.

[28] Eklund, T. 1985. The effect of sorbic acid and esters of *p*-hydroxybenzoic acid on the protonmotive force in *Escherichia coli* membrane vesicles. *J. Gen Microbiol.* 131: 73～76.

[29] Fong, Y. Y., and W. C. Chan. 1973. Bacterial production of di-methyl nitrosamine in salted fish. *Nature* 243: 421～422

[30] Food and Agriculture Organization/World Health Organization (FAO/WHO). 1976. *Evaluation of Certain Food Additives.* WHO Technical Report Series 599.

[31] Freese, E., C. W. Sheu, and E. Galliers. 1973. Function of lipophilic acids as antimicrobial food additives. *Nature* 241: 321～325.

[32] Fung, D. Y. C., C. C. S. Lin, and M. B. Gailani, 1985. Effect of phenolic antioxidants on microbial growth. *CRC Crit. Rev. Microbiol.* 12: 153～183.

[33] Gailani, M. B., and D. Y. C. Fung. 1984. Antimicrobial effects of selected antioxidants in laboratory media and in ground pork. *J. Food Protect.* 47: 428～433.

[34] Gould, G. W. 1964. Effect of food preservatives on the growth of bacteria from spores. In *Microbial Inhibitors in Foods*, ed. G. Molin, 17～24. Stockholm: Almquist & Wiksell.

[35] Gould, G. W., M. H. Brown, and B. C. Fletcher. 1983. Mechanisms of action of food preservation procedures. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*, ed. T. A. Roberts and F. A. Skinner, 67～84. New York: Academic Press.

[36] Gray, J. I., and A. M. Pearson. 1984. Cured meat flavor. *Adv. Food Res.* 29: 1～86.

[37] Hagler, W. M., Jr., J. E. Hutchins, and P. B. Hamilton. 1982. Destruction of aflatoxin in corn with sodium bisulfite. *J. Food Protect.* 45: 1287～1291.

[38] Hamilton-Miller, J. M. T. 1974. Fungal sterols and the mode of action of the polyene antibiotics. *Adv. Appl. Microbiol.* 17: 109～134.

[39] Handford, P. M., and B. M. Gibbs. 1964. Antibacterial effects of smoke constituents on bacteria isolated from bacon. In *Microbial Inhibitors in Food*, ed. G. Molin, 333～346. Stockholm: Almquist &Wiksell.

[40] Hawksworth, G., and M. J. Hill. 1971. The formation of nitrosamines by human intestinal bacteria. *Biochem. J.* 122: 28～29P.

[41] Hawksworth, G., and M. J. Hill. 1971. Bacteria and the *N*-nitrosation of secondary amines. *Brit. J. Cancer* 25: 520～526.

[42] Hechelman, H., and L. Leistner. 1969. Hemmung von unerwunschtem Schimmelpilzwachstum auf Rohwursten durch Delvocid (Pimaricin). *Fleischwirtschaft* 49: 1639～1641.

[43] Holley, R. A. 1981. Prevention of surface mold growth on Italian dry sausage by natamycin and potassium sorbate. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 422～429.

[44] Huhtanen, C. N. 1980. Inhibition of *Clostridium botulinum* by spice extracts and alphatic alcohols. *J. Food Protect.* 43: 195～196, 200.

[15] Hurst, A. 1981. Nisin *Adv. Appl. Microbiol.* 27: 85～123.

[46] Ivey, F. J., K. J. Shaver, L. N. Christiansen, and R. B. Tompkin. 1978. Effect of potassium sorbate on toxinogenesis by *Clostridium botulinum* in bacon. *J. Food Protect* 41: 621～625.

[47] Jay, J. M. 1982. Antimicrobial properties of diacetyl. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 525～532.

48] Jay, J. M. 1982. Effect of diacetyl on foodborne microorganisms. *J. Food Sci.* 47: 1829～1831.

[49] Jay, J. M. 1983. Antibiotics as food preservatives. In *Food Microbiology*, ed. A. H. Rose, 117～143. New York: Academic Press.

[50] Jay, J. M. and G. M. Rivers. 1984. Antimicrobial activity of some food flavoring compounds. *J. Food Safety* 6: 129～139.

[51] Johnston, M. A., and R. Loynes. 1971. Inhibition of *Clostridium botulinum* by sodium nitrite as affected by bacteriological media and meat suspensions. *Can. Inst. Food Technol. J.* 4: 179～184.

[52] Johnston. M. A., H. Pivnick, and J. M. Samson. 1969. Inhibition of *Clostridium botulinum* by sodium nitrite in a bacteriological medium and in meat. *Can Inst. Food Technol. J.* 2: 52～55.

[53] Kabara, J. J. 1981. Food-grade chemicals for use in designing food preservative systems. *J. Food Protect.* 41: 633～647.

[54] Kabara, J. J. 1983. Medium-chain fatty acids and esters. In *Antimicrobials in Foods*, ed. A. L. Branen and P. M. Davidson, 109～139. New York: Marcel Dekker.

[55] Kabara, J. J., R. Vrable, and M. S. F. Lie Ken Jie. 1977. Antimicrobial lipids: Natural and synthetic fatty acids and monoglycerides. *Lipids* 12: 753～759.

[56] Kereluk, K., R. A. Gammon, and R. S. Lloyd. 1970. Microbiological aspects of ethylene oxide sterilization. II. Microbial resistance to ethylene oxide. *Appl. Microbiol.* 19: 152～156.

[57] Klis, J. B., L. D. Witter, and Z. J. Ordal. 1964. The effect of several antifungal antibiotics on the growth of common food spoilage fungi. *Food Technol.* 13: 124～128.

[58] Kueper, T. V., and R. D. Trelease. 1974. Variables affecting botulinum toxin development and nitrosamine formation in fermented sausages. In *Proceedings of the Meat Industry Research Conference*, 69～74. Chicago: American Meat Institute Foundation.

[59] Lin, C. C. S., and D. Y. C. Fung. 1983. Effect of BHA, BHT, TBHQ, and PG on growth and toxigenesis of selected aspergilli. *J. Food Sci.* 48: 576～580.

[60] Lloyd, A. C. 1975. Preservation of comminuted orange products. *J. Food Technol.* 10: 565～567.

[61] Michael, G. T., and C. R. Stumbo. 1970. Ethylene oxide sterilization of *Salmonella senftenberg* and *Escherichia coli*: Death kinetics and mode of action. *J. Food Sci.* 35: 631～634.

[62] Miller, S. A., and W. D. Brown. 1984. Effectiveness of chlortetracycline in combination with potassium sorbate or tetrasodium ethylene-diaminetetraacetate for preservation of vacuum packed rockfish fillets. *J. Food Sci.* 49: 188～191.

63] Miller, M. L., and E. D. Martin. 1990. Fate of *Salmonella enteritidis* and *Salmonella typhimurium* into an Italian salad dressing with added eggs. *Dairy Food Enviton. Sanit.* 10 (1): 12～14.

[64] Ming, X., and M. A. Daeschel. 1995. Correlation of cellular phospholipid content with nisin resis-

tance of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.* 58: 416～420.

[65] Morris, J. A., A. Khettry, and E. W. Seitz. 1979. Antimicrobial activity of aroma chemicals and essential oils. *J. Amer. Oil. Chem. Soc.* 56: 595～603.

[66] Nordin, H. R. 1968. The depletion of added sodium nitrite in ham. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* 2: 79～85.

[67] O'Boyle, A. R., L. J. Rubin, L. L. Diosady, N. Aladin-Kassam, F. Comer, and W. Brightwell. 1990. A. nitrite-free curing system and its application to the production of wieners. *Food Technol.* 44 (5): 88, 90～91, 93, 95～96, 98, 100, 102～104.

[68] O'Leary, V., and M. Solberg. 1976. Effect of sodium nitrite inhibition on intracellular thiol groups and on the activity of certain glycolytic enzymes in *Clostridium perfringens*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 208～212.

[69] Ough, C. S. 1983. Sulfur dioxide and sulfites. In *Antimicrobials in Foods*, ed. A. L. Brahen and P. M. Davidson, 177～203. New York: Marcel Dekker.

[70] Paquette, M. W., M. C. Robach, J. N. Sofos, and F. F. Busta. 1980. Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on color and sensory qualities of commercially prepared bacon. *J. Food Sci.* 45: 1293～1296.

[71] Perigo, J. A., and T. A. Roberts. 1968. Inhibition of clostridia by nitrite. *J. Food Technol.* 3: 91～91.

[72] Perigo, J. A., E. Whiting, and T. E. Bashford. 1967. Observations on the inhibition of vegetative cells of *Clostridium sporogenes* by nitrite which has been autoclaved in a laboratory medium, discussed in the context of sublethally processed meats. *J. Food Technol.* 2: 377～397.

[73] Pierson, M. D., and N. R. Reddy. 1982. Inhibition of *Clostridium botulinum* by antioxidants and related phenolic compounds in comminuted pork. *J. Fook Sci.* 47: 1926～1929, 1935.

[74] Rayman, K., N. Malik, and A. Hurst. 1983. Failure of nisin to inhibit outgrowth of *Clostridium botulinum* in a model cured meat system. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 1450～1452.

[75] Reddy, D., J. R. Lancaster, Jr., and D. P. Cornforth. 1983. Nitrite inhibition of *Clostridium botulinum*: Electron spin resonance detection of iron-nitric oxide complexes. *Science* 221: 769～770.

[76] Riemann, H. 1963. Safe heat processing of canned cured meats with regard to bacterial spores. *Food Technol.* 17: 39～49.

[77] Robach, M. C., and M. D. Pierson. 1979. Inhibition of *Clostridium botulinum* types A and B by phenolic antioxidants. *J. Food Protect.* 12: 858～861.

[78] Robach, M. C., and M. D. Pierson. 1978. Influence of para-hydroxybenzoic acid esters on the growth and toxin production of *Clostridium botulinum* 10755A. *J. Food Sci.* 43: 787～789, 792.

[79] Roberts, T. A., A. M. Gibson, and A. Robinson. 1981. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. II. Growth in pork slurries prepared from "high" pH meat (range 6. 3～6. 8). *J. Food Technol.* 16: 267～281.

[80] Roberts, T. A., A. M. Gibson, and A. Robinson. 1982. Factors controlling the growth of *Clostridium botulinum* types A and B in pasteurized, cured meats. III. The effect of potassium sorbate. *J. Food Technol.* 17: 307～326.

[81] Roberts, T. A., and M. Ingram. 1966. The effect of sodium chloride, potassium nitrate and sodium nitrite on the recovery of heated bacterial spores. *J. Food Technol.* 1: 147～163.

[82] Roberts, T. A., and J. L. Smart. 1974. Inhibition of spores of *Clostridium* spp. by sodium nitrite. *J. Appl. Bacteriol.* 37: 261～264

[83] Ronning, I. E., and H. A. Frank 1988. Growth response of putrefactive anaerobe 3679 to combinations of potassium sorbate and some common curing ingredients (sucrose, salt, and nitrite), and to noninhibitory levels of sorbic acid. *J. Food Protect.* 51: 651～654.

[84] Ronning, I. E., and H. A. Frank. 1987. Growth inhibition of putrefactive anaerobe 3679 caused by stringent-type response induced by protonophoric activity of sorbic acid. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1020～1027.

[85] Sahl, H. -G., M. Kordel, and R. Benz. 1987. Voltage-dependent depolarization of bacterial membranes and artificial lipid bilayers by the peptide antibiotic nisin. *Arch. Microbiol.* 149: 120～124

[86] Savage, R. A., and C. R. Stumbo. 1971. Characteristics of progeny of ethylene oxide treated *Clostridium botulinum* type 62A spores. *J. Food Sci.* 36: 182～184.

[87] Scott, V. N., and S. L. Taylor. 1981. Effect of nisin on the outgrowth of *Clostridium botulinum* spores. *J. Food Sci.* 46: 117～120, 126.

[88] Seward, R. A., R. H. Deibel, and R. C. Lindsay. 1982. Effects of potassium sorbate and other antibotulinal agents on germination and outgrowth of *Clostidium botulinum* type E spores in microcultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 14: 1212～1221.

[89] Shahidi, F., L. J. Rubin, L. L. Diosady, V. Chew, and D. F. Wood. 1984. Preparation of dinotrosyl ferrohemochrome from hemin and sodium nitrite. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 17: 33～37.

[90] Shelef, L. A. 1983. Antimicrobial effects of spices. *J. Food Safety* 6: 29～44.

[91] Shelef, L. A., and P. Liang. 1982. Antibacterial effects of butylated hydroxyanisole (BHA) against *Bacillus* species. *J. Food Sci.* 47: 796～799.

[92] Shelef, L. A., O. A. Naglik, and D. W. Bogen. 1980. Sensitivity of some common food-borne bacteria to the spices sage, rosemary, and allspice. *J. Food Sci.* 45: 1042～1044.

[93] Sofos, J. N. 1989. *Sorbate Food Preservatives.* Boca Raton, FL: CRC Press.

[94] Sofos, J. N., F. F. Busta, and C. E. Allen. 1980. Influence of pH on *Clostridium botulinum* control by sodium nitrite and sorbic acid in chicken emulsions. *J. Food Sci.* 15: 7～12.

[95] Sofos, J. N., F. F. Busta, K. Bhothipaksa, C. E. Allen, M. C. Robach, and M. W. Paquette, 1980. Effects of various concentrations of sodium nitrite and potassium sorbate on *Clostridium botulinum* toxin production in commercially prepared bacon. *J. Food Sci.* 45: 1285～1292.

[96] Splittstoesser, D. F., and M. Wilkison. 1973. Some factors affecting the activity of diethylpyrocarbonate as a sterilant. *Appl. Microbiol.* 25: 853～857.

[97] Swartling, P., and B. Lindgren. 1968. The sterilizing effect against *Bacillus subtilis* spores of hydrogen peroxide at different temperatures and concentrations. *J. Dairy Res.* 35: 423～428.

[98] Tanaka, N., N. M. Gordon, R. C. Lindsay, L. M. Meske, M. P. Doyle, and E. Traisman. 1985. Sensory characteristics of reduced nitrite bacon manufactured by the Wisconsin process. *J. Food Protect.* 48: 687～692.

[99] Tanaka, N., L. Meske, M. P. Doyle, E. Traisman, D. W. Thayer, and R. W. Johnston. 1985. Plant trials of bacon made with lactic acid bacteria, sucrose and lowered sodium nitrite. *J. Food Protect.* 18: 679～686.

[100] Tanaka, N., E. Traisman, M. H. Lee, R. G. Cassens, and E. M. Foster. 1980. Inhibition

of botulinum toxin formation in bacon by acid development. *J. Food Protect.* 43: 150～157.

[101] Tarr, H. L. A., B. A. Southcott, and H. M. Bissett. 1952. Experimental preservation of flesh foods with antibiotics. *Food Technol.* 6: 363～368.

[102] Thompson, D. P., L. Metevia, and T. Vessel. 1993. Influence of pH alone and in combination with phenolic antioxidants on growth and germination of mycotoxigenic species of *Fusarium* and *Penicillium*. *J. Food Protect.* 56: 134～138.

[103] Toledo, R. T. 1975. Chemical sterilants for aseptic packaging. *Food Technol.* 29 (5): 102～107.

[104] Toledo, R. T., F. E. Escher, and J. C. Ayres. 1973. Sporicidal properties of hydrogen peroxide against food spoilage organisms. *Appl. Microbiol.* 26. 592～597.

[105] Tompkin, R. B. 1983. Nitrite. In *Antimicrobials in Foods*, ed. A. L. Branen and P. M. Davidson, 205～206. New York: Marcel Dekker.

[106] Tompkin, R. B., L. N. Christiansen, and A. B. Shaparis. 1978. Enhancing nitrite inhibition of *Clostridium botulinum* with isoascorbate in perishable canned cured meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 59～61.

[107] Tompkin, B. L., L. N. Christiansen, and A. B. Shaparis. 1978. Causes of variation in botulinal inhibition in perishable canned cured meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 886～889.

[108] Tompkin, B. L., L. N. Christiansen, and A. B. Shaparis. 1979. Iron and the antibotulinal efficacy of nitrite. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 351～353.

[109] Tompkin, B. L., L. N. Christiansen, and A. B. Shaparis. 1980. Antibotulinal efficacy of sulfur dioxide in meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1096～1099.

[110] Vareltzis, K., E. M. Buck, and R. G. Labbe. 1984. Effectiveness of a betalains/potassium sorbate system versus sodium nitrite for color development and control of total aerobes, *Clostridium perfringens* and *Clostridium sporogenes* in chicken frankfurters. *J. Food Protect.* 47. 532～536.

[111] Vas, K., and M. Ingram. 1949. Preservation of fruit juices with less SO_2. *Food Manuf.* 24: 414～416.

[112] Winarno, F. G., and C. R. Stumbo. 1971. Mode of action of ethylene oxide on spores of *Clostridium botulinum* 62*A*. *J. Food Sci.* 36: 892～895.

[113] Wood, D. S., D. L. Collins-Thompson, W. R. Usborne, and B. Picard. 1986. An evaluation of antibotulinal activity in nitrite-free curing systems containing dinitrosyl ferrohemochrome. *J. Food Protect.* 49: 691～695.

[114] Woods, L. F. J., and J. M. Wood. 1982. A note on the effect of nitrite inhibition on the metabolism of *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 109～110.

[115] Woods, L. F. J., J. M. Wood, and P. A. Gibbs. 1981. The involvement of nitric oxide in the inhibition of the phosphoroclastic system in *Clostridium sporogenes* by sodium nitrite. *J. Gen. Microbiol.* 125: 399～406.

[116] Yarbrough, J. M., J. B. Rake, and R. G. Egon. 1980. Bacterial inhibitory effects of nitrite: Inhibition of active transport, but not of group translocation, and of intracellular enzymes. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 831～834.

[117] Yun, J., F. Shahidi, L. J. Rubin, and L. L. Diosady. 1987. Oxidative stability and flavour acceptability of nitrite-free curing systems. *Can. Inst. Food. Sci. Technol. J.* 20: 246～251.

[118] Zaika, L. L., J. C. Kissinger, and A. E. Wasserman. 1983. Inhibition of lactic acid bacteria by herbs. *J. Food Sci.* 48: 1455～1459.

14. 食品辐射保藏与微生物的耐辐射特性

早在 1929 年，辐射保藏食品技术就取得了专利。但是该食品保藏技术直到二次大战后才得到重视。尽管食品辐射技术的深入应用略显缓慢，但这种技术的广泛应用却引起了食品微生物学家和其它食品学家的兴趣。

辐射就是能量在空间或某一介质进行传播和扩展。最初用于食品保藏的辐射类型是电磁波。电磁光谱如图 14.1 所示。按波长的长短来划分，可分为不同的辐射源。越短的波长对微生物越具杀伤力。就食品辐射保藏而言，电磁光谱又可以细分为微波、紫外线、X-射线和 γ-射线。最先考虑的食品保藏辐射源是电离辐射，其波长为 200nm 或更短，例如：α-射线、β-射线、γ-射线、X-射线和宇宙射线。它们的量子在放射时有足够的能量来电离分子，由于它们在杀伤微生物的同时并没有引起温度的升高，因此这种杀菌过程又称为“冷灭菌”。

关于辐射在食品方面的应用，需要明确几个有用的概念。测定 X-射线或 γ-射线照射剂量的单位用 C/kg 表示：一贝可（Bq）是指每秒钟有 1 个原子衰变的放射性物质的数量单位。实际应用中常用 1g 纯镭的放射活性称为 3.7×10^{-9}Bq 镭。戈（Gy）是一个吸收辐射剂量单位。电子伏特（eV）是指 1 个电子通过电位差为 1V 的电场中所获得的动能，$1MeV=1\times10^{6}eV$。戈和电子伏特（eV）都是辐射强度单位。

14.1 不同射线在食品保藏中的辐射特点

14.1.1 紫外线

紫外线（UV Light）是一种强有力的杀菌剂，在波长为 260nm 时杀菌效果最好。这是一种非电离辐射，蛋白质和核酸吸收紫外线产生光化学反应，从而导致细胞死亡。细菌细胞的紫外线致死机理是：紫外线作用于细胞核酸，使其产生致死突变。紫外线的穿透能力不强，只能杀灭食品表面的细菌。另外，紫外线辐射食品时会促进氧化反应，从而产生食品氧化酸败、脱色以及其它一些不良结果。紫外线用于某些食品表面处理时会产生少量的臭氧。有时紫外线也用于对包装前的水果蛋糕和相关产品进行表面处理。

14.1.2 β-射线

β-射线是放射物质发出的电子流．阴极射线除了是从真空管阴极发出外，其它与 β-射线相同。这些射线穿射能力都不强。商业用的阴极射线来源于 Van de Graaff 发电机和线性加速器。后者似乎更适合用于食品保藏。采用的阴极射线其能级必须低于可能导致某些食品有辐射性的能级上限。

14.1.3 γ-射线

γ-射线是一种被激活的元素原子核，如^{60}Co和^{137}Cs放出的电磁辐射波，它们对于食品保藏相当重要，也是食品保藏中一种最为廉价的辐射形式。因为辐射源元素既可以是原子裂变的副产品，也可以是原子裂变的废弃产品。γ-射线的穿透力很强，这点正好与β-射线相反。^{60}Co的半衰期大约为5年；^{137}Cs的半衰期大约为30年。

14.1.4 X-射线

X-射线是真空管中高压电子（阴极射线）轰击重金属靶产生的，其它方面基本上与γ-射线相同。

14.1.5 微波

能产生微波的原理说明如下[20]。将呈电中性的食品置于电磁场中，由于分子本身电荷分布不均匀，在电磁场作用下正电端向负极运动，负电端向正极运动。这样一来，随着交变电场的迅速交替，每一个不对称分子的运动都试图与交变电场保持一致，从而分子随交变电场方向改变而作规则运动，相邻分子间的摩擦就表现为热效应，这就是微波能量。绝大多数食品研究采用的微波频率有两种：915MHz和2450MHz。当微波频率为915MHz时，分子前后摆动的频率为915×10^6次/s[20]。微波介于红外线与电磁光谱中的部分无线电频率之间(图14.1)。有关微波杀灭猪肉制品中毛线虫藻类的问题参见第七部分27。

14.2 各种辐射对微生物致死作用的基本原理

研究辐射对微生物作用这一问题时必须考虑以下几个因素，下面分别进行讨论。

14.2.1 菌的种类

革兰氏阳性菌的耐辐射性比革兰氏阴性菌强得多。总的来说，芽孢菌的耐辐射能力远大于非芽孢菌（除4个属中的7个种外，见本部分后面讨论）。芽孢菌中，*Paenibacillus Larvae*似乎比绝大多数需氧芽孢菌的耐辐射能力强。A型肉毒梭状芽孢杆菌孢子是所有梭状孢子中耐辐射能力最强的一种。除了7种耐辐射能力极强的菌外，粪肠球菌R53、微球菌、同型发酵乳酸菌是所有非芽孢菌中耐辐射能力最强的。对辐射最敏感的细菌有假单胞菌和黄杆菌，其它革兰氏阴性菌均介于中间。从酶到高级动物对辐射敏感性的总图谱如图14.2所示。菌耐辐射的可能机理如下面的讨论。

除了已提到的芽孢和几个抗性极强的菌种之外，细菌耐辐射能力基本上与其抗热性相似。

对于对辐射敏感的霉菌和酵母菌来说，后者耐辐射的能力要强于前者，但两者耐辐射的能力都不如革兰氏阳性菌强。据报道，有些假丝酵母菌的耐辐射能力与某些细菌的芽孢相当。

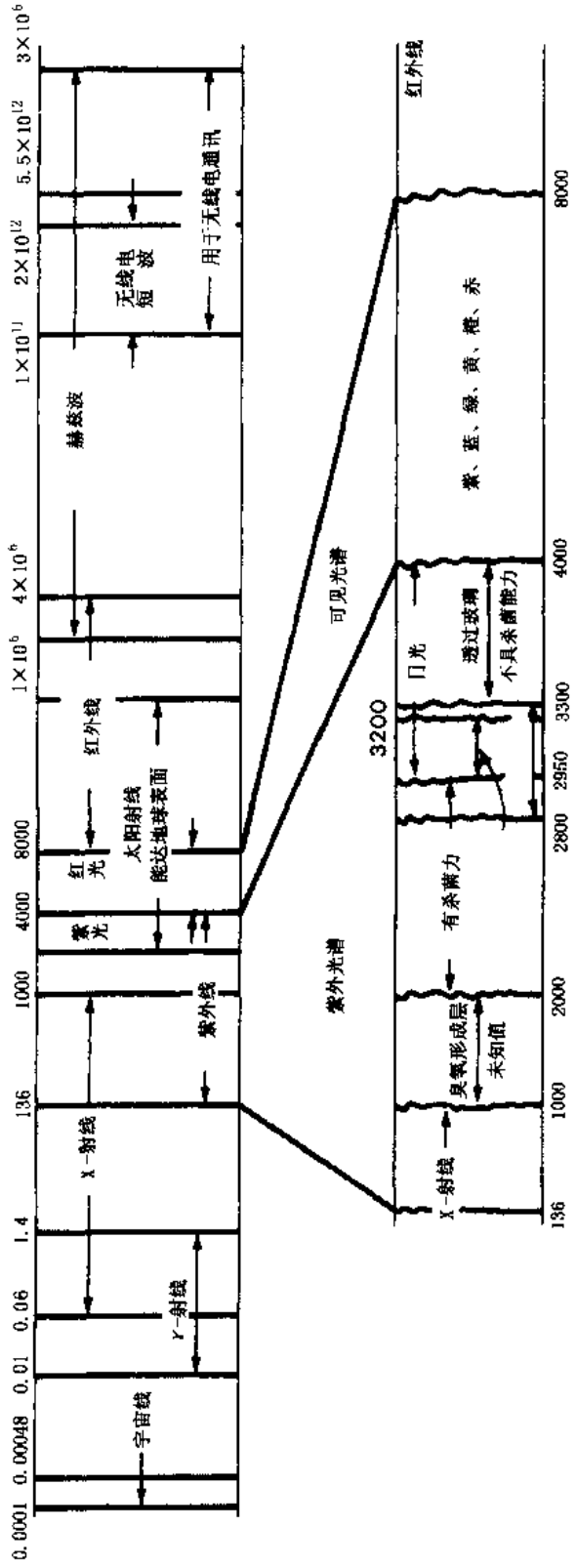


图 14.1　光谱图

注：以 Å 为单位，Å 为光波和紫外线的波长单位，1 Å 相当于 10^{-10}m。

14.2.2 微生物数量

微生物数量对辐射作用的效果的影响和对加热、化学杀菌等作用的效果的影响是一样的。同时，其它确实的现象是：细胞数量越多，一定剂量的作用效果就越小。

14.2.3 悬浮介质的构成

一般来说，悬浮在缓冲液中的微生物要比在含蛋白质介质中的微生物对辐射敏感。例如，Midura 等人研究发现[46]：产气荚膜梭状芽孢杆菌在磷酸缓冲溶液中的辐射 D 值为 0.23Gy，而在肉汤中的 D 值为 3kGy。蛋白质对微生物有保护作用，同时蛋白质削弱了抗菌化学物质和热对微生物的作用效果。多项实验表明，硝酸盐的存在可使细菌芽孢对辐射变得更为敏感。

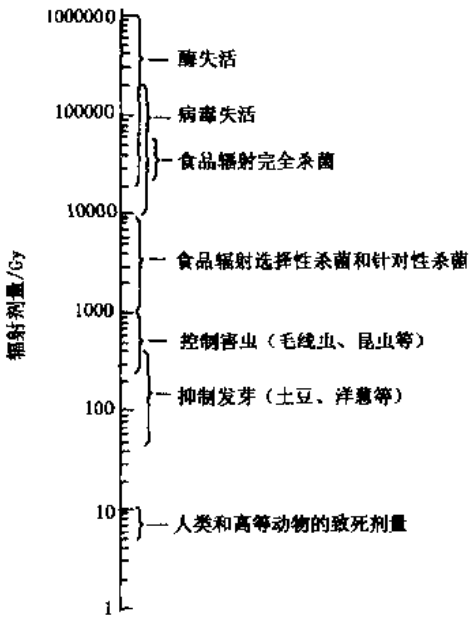


图 14.2 不同用途的辐射剂量范围[24]

14.2.4 氧气的存在与否

微生物耐辐射的能力在无氧时要比有氧时强。据报道，埃希氏大肠杆菌的细胞悬浮液，在无氧时其耐辐射能力要比有氧时高 3 倍之多[52]。若在介质中添加诸如硫氢基化合物等还原性物质，也能提高其耐辐射能力，效果与无氧情况相当 。

14.2.5 食品的物理形态

一般来说，干细胞的耐辐射能力要比湿细胞强，这极可能是由于电离辐射导致水辐射离解的直接结果。这将在本部分后面讨论，冰冻细胞的耐辐射能力要比非冰冻细胞[39]强。Grecz 等人[22]研究发现，与 0℃时相比，－196℃时 γ-射线对牛肉糜中微生物的致死率要降低 47%。

14.2.6 菌龄

处于细菌分裂之前的滞后期，细菌的耐辐射能力最强，随着细胞进入对数生长期，细胞对辐射的敏感性逐渐增大，当对数生长期即将结束时，细菌的耐辐射能力也达到了最低点。

14.3 食品辐射处理的工艺过程

与罐头食品或冷冻食品的制作工艺相似，食品在进行电离辐射处理之前还需要进行几方面的预处理。

14.3.1 食品原料的筛选

选取新鲜优质食品用于辐射处理，特别要注意避免采用已处于腐烂早期的食品。

14.3.2 食品原料的清洗

清洗掉食品原料中的所有碎屑与脏物，以降低辐射处理所要破坏的菌量。

14.3.3 包装

辐射处理食品前应事先对食品进行包装，以避免辐射过度造成的污染。若食品装在洁净的玻璃容器中，当辐射剂量达到 10kGy 时就可使食品变色，导致辐射处理后食品感观质量下降。

14.3.4 热烫或热处理

辐射灭菌的剂量不足以破坏食品中自然存在的酶（图 14.2），但是为了避免辐射后食品发生不利的化学变化，进行灭酶处理是必要的。最好的方法是热处理，即在辐射处理前将蔬菜进行热烫，对肉制品进行中温热处理。

14.4 射线的应用

食品辐射中使用最广泛的两种技术是来自^{60}Co或^{137}Cs的γ-射线辐射和来自直线加速器的电子流。

14.4.1 γ-射线

利用γ-射线的优点在于^{60}Co和^{137}Cs都是相对廉价的原子裂变副产品。一般放射实验室就是利用这些元素来获得射线的。将放射性物质置于升降器顶端，使用时升起升降器，不用时则将升降器降至水下。被辐射的物质根据辐射剂量的要求，置于离放射源合适的距离范围内，当实验室人员全部离开后，放射源上升到放射位置，γ-射线就可辐射食品。若想将食品放置在一定温度下辐射，可以通过两种方法：一种是将样品置于可调温度的容器内，另一种方法是控制全铅衬混凝土墙实验室内的温度。使用放射性物质的不足之处在于同位素放射源发出的射线是漫射型的，不能像所要求的那样用开或关来控制（图 14.3）。另外，^{60}Co的半衰期短（5.27 年），需要经常更换放射源以保持放射能（radioactive potential）达到所需的水平。若使用^{137}Cs，就能克服这一缺陷，因为^{137}Cs的半衰期大约有 30 年。

14.4.2 电子束/加速电子

利用电子加速器比放射性元素具有一定的优势，因此这种辐射形式有更广阔的工业应用前景。Koch 和 Eisenhower[134]将之归纳如下：

①初级电子束能量直接吸收的高效性，意味着它具有产业化生产的能力。

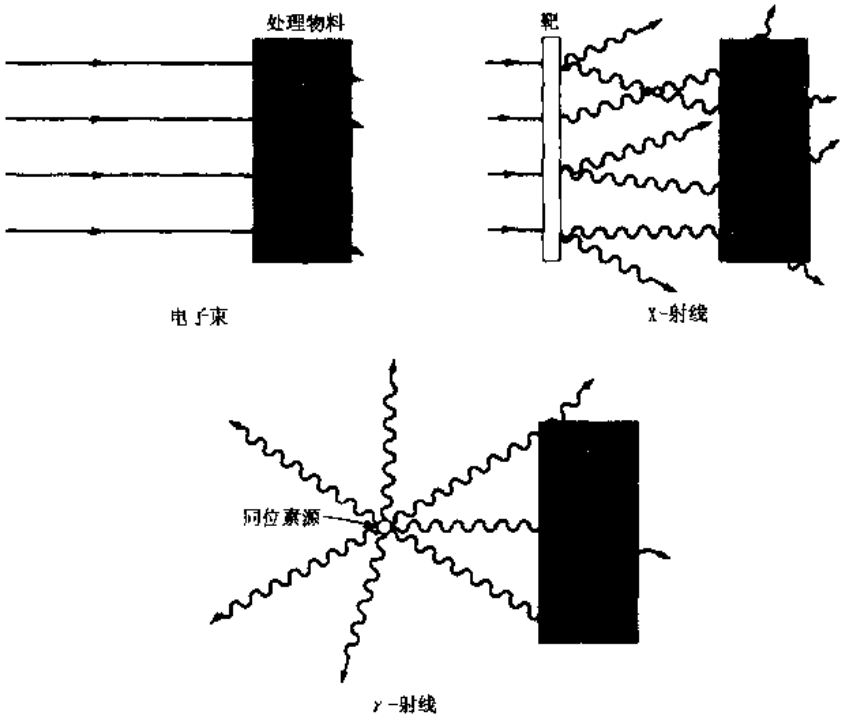


图 14.3 辐射处理的三种基本方法
电子束、X 射线、γ-射线与介质的相互作用

②电子能向 X 射线能的有效转化，意味着它具有处理电子束或γ-射线不能穿透的极厚产品的能力。

③电子束电流和能量容易调节，意味着对于不同食品种类、条件及季节，在表面和深度处理的选择上有一定的灵活性。

④在高能量下，初级和次级电子以及 X-射线的单向特性，使得食品的包装设计有很大的灵活性。

⑤使用简易的电子探测仪和电路及不同的电子束参数，就可实现从这一刻到下一刻的自动调节和按程序工作的能力，意味着它能有效处理各类小的、复杂的或形状不规则的物质。

⑥电子加速器开与关操作容易，一旦关闭，在休班或休假期间就不存在维持问题，而且放射源可以运输，不需要巨大的辐射防护罩。

γ-射线和加速电子流有两点区别是值得注意的。第一是穿透力，γ-射线的穿透力比加速电子流强，但后者的穿透力随能量的增加而增加。例如，10MeV 的电子要比 4MeV 的电子具有更强的穿透力。第二是剂量比率 (dose rate)，^{60}Co 产生的 γ-射线比率为 1～100Gy min，而电子加速器的电子束比率则为 10^3～10^5Gy/s。

14.5 食品的辐射完全灭菌、辐射针对性灭菌和辐射选择性灭菌

起初，电离辐射对食品微生物的致死作用这一术语是由热力和化学对微生物的致死

作用衍生而来的。虽然微生物在化学、热力和辐射作用下确实可以发生致死效应，但对于辐射处理食品来说，使用这一术语尚不够准确。因此，1964 年，国际微生物学专家小组建议使用以下辐射处理食品的术语[21]。

辐射完全灭菌 (Radappertization)：相当于辐射灭菌或“商业无菌”，因为这一名词在罐头工业中已延用多年，其标准辐射剂量为 30～40kGy。

辐射针对灭菌 (Radicidation)：类似于巴斯德灭菌，如牛乳的灭菌。特别是指以降低活的特定的非芽孢病原菌而非病毒的数量为目的的灭菌。其标准辐射剂量为 2.5～10kGy。

辐射选择性灭菌 (Radurization)：也可认为与巴斯德灭菌相当。是指通过辐射灭菌来真正降低活的特殊腐败菌的数量，以达到延长食品保质期目的的杀菌方法。对鲜肉、家禽、海产品、水果、蔬菜及谷类作物而言，一般辐射剂量为 0.75～2.5kGy。

14.5.1 辐射完全灭菌

任何食品的辐射完全灭菌都可以通过一定条件下使用适当的辐射剂量来实现。用这种方法处理芽孢和肉毒梭状芽孢杆菌外毒素的效果相当不错。据报道，E 型孢子的辐射 D 值大约为 1.2～1.7kGy[62]。而 Kempe[32]发现 A 型和 B 型孢子的 D 值分别为 2.79kGy 和 2.38kGy。三类孢子中 E 型孢子对辐射最敏感。

辐射温度对肉毒梭状芽孢杆菌孢子 D 值的影响见表 14.1。从表中可知，温度较低时，微生物的耐辐射性增强，温度较高时，微生物的耐辐射性减弱[23]。不同接种水平对辐射 D 值没有明显的影响，D 值是基于线性致死速率计算而得的。存在于 3 种食品中的 4 株肉毒梭状芽孢杆菌的 D 值见表 14.2 所示。从表中可知：每种产品中，每一菌株耐辐射的能力都不相同。腌制肉品的辐射 D 值最小（这点的意义可见第四部分 13 中硝酸盐和亚硝酸盐的讨论）。9 种肉和鱼制品的完全灭菌的辐射最低剂量 (MRD) 见下面所列[3,4,30]。除腊肉外（室温辐射），其它每一种的处理温度为－30℃＋10（单位：kGy）：

腊肉	23	汉堡	37	鳕鱼糕	32
牛肉	47	猪肉	51	咸牛肉	25
鸡肉	45	虾	37	猪肉香肠	24～27

表 14.1 辐射温度对两批不同浓度牛肉糜中的肉毒梭状芽孢杆菌 33A 的 D 值的影响

温度/℃	D 值/kGy	
	～5×10^6 个孢子/罐	～2×10^8 个孢子/罐
－196	5.77	5.95
－150	5.32	5.43
－100	4.83	4.86
－50	4.34	4.30
0	3.85	3.73
25	3.60	3.45
65	3.21	2.99

注：D 值是以孢子线性致死为基础。

表 14.2 −30℃下3种肉制品中肉毒梭状芽孢杆菌 D 值差异性比较[13]

菌株编号	D 值/kGy		
	鳕鱼糕点	咸牛肉	猪香肠
33A	2.03	1.29	1.09
77A	2.38	2.62	0.98
41B	2.45	1.92	1.84
53B	3.31	1.83	0.76

注：(1) 按 Schmidt 方程计算。

(2) 资料来源：Anellis 等人[18]1972，美国微生物协会。

对各种肉制品，处理温度为30℃左右时，为达到12D的处理要求，需要满足的辐射剂量（kGy）为：牛肉和鸡肉41.2～42.7；汉堡和鳕鱼糕31.4～31.7；猪肉43.7；咸牛肉和猪香肠25.5～26.9。各种辐射处理方式不会使食物有放射活性[15]。

Roberts 和 Lngram[63]对处于水介质中的肉毒梭状芽孢杆菌孢子的耐辐射性能进行了研究，发现所得 D 值大大低于在肉制品介质中 kGy 所得的 D 值。3个A型菌株的 D 值为1.0～1.4kGy；两个B型菌株的 D 值为1.0～1.1kGy；两个E型菌株的 D 值为0.8～1.6kGy；一个F型菌株的 D 值为2.5kGy。所有菌株的辐射温度均在18～23℃。D 值计算中假定指数致死率为定值。

关于辐射对产气荚膜梭状芽孢杆菌的影响，5种不同类型的菌株（A、B、C、E和F型）在水介质中的 D 值都在1.5～2.5kGy之间[163]。根据菌株和计算12D值剂量方法的不同，这种微生物其8个菌株的12D值在30.4～41.4kGy之间。

白色干酪和冰淇淋中单核细胞增生李斯特菌的辐射 D_{10} 值分别为1.4kGy和2.0kGy，Scott A 菌株的辐射温度为−78℃。其各自计算所得的12D值为16.8kGy和24.4kGy。40kGy足以对冰淇淋和冰冻酸乳进行辐射完全灭菌，但该剂量对白色干酪或切达干酪还是不够的[126]。而对奶酪和冰淇淋中的蜡状芽孢杆菌，其辐射完全灭菌剂量为40～50kGy。

如图14.2所示，病毒的耐辐射能力比细菌强得多。Sullivan 等人研究发现：30种病毒在含有2%血清的Eagle最低基础培养基中的辐射 D 值为3.9～5.3kGy。这30种病毒包括科塞奇病毒、艾柯病毒和脊髓灰质炎病毒。选择5种病毒置于蒸馏水中用^{60}Co辐射，其 D 值在1.0～1.4kGy之间。科塞病毒B 2在温度分别为−30℃和−90℃的不同介质中的 D 值列于表14.3中。若用12D辐射处理肉制品中的肉毒梭状芽孢杆菌，假如没有事先用加热等方法进行预处理，将会有病毒粒子残存。

酶也有很强的耐辐射能力，20～60kGy剂量最多只能破坏牛肉糜中蛋白酶活力的75%，但是，如果辐射剂量增至45～52kGy，并在64℃或70℃下进行热烫处理，则至少可以破坏牛肉糜中蛋白酶活力的95%。不同微生物的辐射 D 值列于表14.4中。

应用辐射的主要缺点是：辐射处理某些食物时会引起颜色改变或产生退色现象。因此，工业化辐射灭菌的应用在辐射灭菌过程中颜色和风味变化较少的食品种类中受到了青睐。在腊肉中的应用就是一个很好的例子，经辐射完全灭菌后，无论是颜色还是风味

变化都很小。品味的平均得分值与对照组腊肉的相当接近，对照组只略微高一点[84]。大多数辐射产品的品味评定值都在满意的分值范围内。

表 14.3　　科塞奇病毒 B-2 的 *D* 值

悬浮基质	*D* 值/kGy	
	−30 C	−90 C
Eagle 最低基础培养基−2%血清	6.9	6.4
蒸馏水		5.3
熟牛肉糜	6.8	8.1
生牛肉糜	7.5	6.8

注：(1) 计算 *D* 值时假设成线性关系。

(2) 摘自 Sullivan 等人[63]，1973，美国微生物协会。

表 14.4　　报道的各种辐射 *D* 值

微生物/物质	*D* 值/kGy	参考文献
细菌		
醋酸钙不动杆菌	0.26	76
嗜水气单胞菌	0.14	55
短小芽孢杆菌孢子	1.40	76
肉毒梭状芽孢杆菌、E 型孢子	1.1～1.7	16，41
肉毒梭状芽孢杆菌、白鲟 E 型	0.8	43
肉毒梭状芽孢杆菌、62A 孢子	1.0	43
肉毒梭状芽孢杆菌、A 型孢子	2.79	23
肉毒梭状芽孢杆菌、B 型孢子	2.38	23
肉毒梭状芽孢杆菌、F 型孢子	2.5	43
肉毒梭状芽孢杆菌 A 型毒素、肉浆	36.08	64
双发酵梭状芽孢杆菌孢子	1.4	43
丁酸梭状芽孢杆菌孢子	1.5	43
产气荚膜梭状芽孢杆菌 A 型孢子	1.2	43
生芽孢梭状芽孢杆菌孢子（PA3679/S_2）	2.2	43
索氏梭状芽孢杆菌孢子	1.5	43
阴沟肠杆菌	0.18	76
埃希氏大肠杆菌	0.2	76
单核细胞增生李斯特菌	0.42～0.55	56
单核细胞增生李斯特菌（7 个菌株平均）	0.35	28
单核细胞增生李斯特菌	0.42～0.43	1

续表

微生物/物质	D值/kGy	参考文献
5℃的牛肉中	0.44	72
0℃的牛肉中	0.45	72
−20℃的牛肉中	1.21	72
苯丙酮酸摩氏杆菌	0.86	57
恶臭假单胞菌	0.08	57
铜绿假单胞菌	0.13	76
伤寒沙门氏菌	0.50	56
肠炎沙门氏菌、22℃的禽肉	0.37	48
肠炎沙门氏菌、15℃的禽肉	0.33	48
沙门氏细菌属	0.13	76
金色葡萄球菌	0.16	76
金色葡萄球菌A型肉毒素、肉浆	61.18、208.49	64
小肠结肠炎耶尔森氏菌、25℃牛肉	0.195	14
小肠结肠炎耶尔森氏菌、30℃牛肉糜	0.388	14
真菌		
黄曲霉孢子（平均数）	0.66	61
黄曲霉	0.055～0.06	66
黑曲霉	0.042	66
柠檬青霉，NRRL5452	0.88	61
青霉	0.42	76
病毒		
腺病毒（4株）	4.1～4.9	45
科塞奇病毒	4.1～5.0	45
艾木可病毒	4.4～5.1	45
Herpes Simplex	4.3	45
脊髓灰质炎病毒	4.1～5.4	45

培根的辐射完全灭菌也是减少硝酸胺的一种方法。若用30kGy辐射剂量对含20mg/kg $NaNO_2$和550mg/kg抗坏血酸钠的培根进行辐射处理，其结果是其硝酸胺的含量与不含亚硝酸的培根的相当[15]。

14.5.2 辐射针对性灭菌

许多实验已表明，2～5kGy辐射剂量能杀灭非芽孢和非病毒致病菌，而且对健康无害。Kampelmacher[51]指出：生家禽肉的辐射剂量应是最高的，这是因为家禽经常遭受沙门氏菌感染，而且辐射针对性杀菌又只对包装产品有效，包装的目的是消除交叉感染的

可能性。而对于冰冻或冷冻鸡肉的辐射处理，用 2.5kGy 的辐射剂量可以有效地杀灭沙门氏菌[49]。世界卫生组织（WHO）已经批准最高辐射剂量为 7kGy 作为“人类无条件安全剂量”[16]。若用 5kGy 对整个可可豆进行辐射处理，可以破坏其 99.9%的细菌，并使柠檬青霉孢子数降低约 5lgs/g[61]，采用 4kGy 剂量时，黄曲霉孢子数可降低约 7lgs/g。在一些国家已批准对新鲜禽肉、鳕鱼和红鱼以及香料和调味料等实施辐射针对性灭菌（表 14.5）。

表 14.5　　WHO 和不同国家批准食物和食品的辐射剂量[78]

食品	目的	剂量/kGy	国家代号[a]
土豆	抑制发芽	0.1～0.15	17
洋葱	抑制发芽	0.1～0.15	10
大蒜	抑制发芽	0.1～0.15	2
蘑菇	抑制生长	2.5（最大）	1
小麦、小麦粉	杀死昆虫	0.2～0.75	1
干果	杀死昆虫	1.0	2
可可豆	杀死昆虫	0.7	1
浓缩干食品	杀死昆虫	0.7～1.0	1
禽肉、鲜肉	辐射针对性灭菌[b]	7.0（最大）	7
鳕鱼和红鱼	辐射针对性灭菌	2.0～2.2	1
调料/配料	辐射针对性灭菌	8.0～10.0	1
半保藏肉制品	辐射选择性灭菌	6.0～8.0	1
鲜果[c]	辐射选择性灭菌	2.5	6
芦笋	辐射选择性灭菌	2.0	1
鲜肉	辐射选择性灭菌	6.0～8.0	1
鳕鱼及鳕鱼片	辐射选择性灭菌	1.5（最大）	1
家禽（去内脏）	辐射选择性灭菌	3.0～6.0	2
虾	辐射选择性灭菌	0.5～1.0	1
烹饪肉制品	辐射选择性灭菌	8.0	1
深冻膳食	辐射完全灭菌	25.0（最小）	2
新鲜、听装/液体食品	辐射完全灭菌	25.0（最小）	1

注：资料来源 Urbain[78]。

[a] 包括 WHO 推荐的。

[b] 对沙门氏菌。

[c] 包括土豆、桃、杏（美洲李）、草莓、樱桃、葡萄等。

对已接种有约 10^5/g 埃希氏大肠杆菌 O157：H7 的牛排以 1.5kGy 的剂量进行辐射处理，能够彻底杀灭菌细胞[17]。在同一条件下，小肠结肠炎耶尔森氏菌数可降至不可测

出的水平。而对接种有 A 型和 B 型肉毒杆菌的约 400 个孢子的机械去骨鸡肉以 1.5kGy 或 3.0kGy 的辐射剂量进行辐射处理，该产品冷藏 4 周后没有一个样品发现有产毒现象。但是，样品如存放于 28℃的环境中，则在 18h 内就会产生毒素[71]。在类似的产品中，起初，肠炎沙门氏菌浓度为 lg3.86/g，5℃下放置 4 周后，浓度降至＜10cfu/g。

14.5.3 辐射选择性灭菌

辐射处理能延长海产食品、蔬菜及水果的货架期已为许多研究所证实。经 1～4kGy 剂量选择性辐射灭菌处理的虾、蟹、鳕鱼、扇贝和蛤蜊，其货架期可延长 2～6 倍。对处于不同包装条件下的鱼类和贝壳类的试验都取得了类似的结果[53]。在一项研究中，扇贝在 0℃下贮藏，其货架期为 13d，而分别用 0.5kGy、1.5kGy 和 3.0kGy 辐射剂量处理后，货架期分别提高至 18d、23d 和 42d[58]。革兰氏阴性非芽孢杆菌是所有细胞中对辐射最敏感的一类菌，而它们恰恰是这些食品的主要腐败菌。用 1.0kGy 剂量对真空包装的猪肉糜进行辐射处理，并在 5℃下贮存 9d，辐射后残留的菌群中 97%是革兰氏阳性菌，且大多数为棒状形杆菌[13]。属于摩氏杆菌属和不动杆菌属的一些革兰氏阴性球杆菌，其耐辐射能力要比其它所有的革兰氏阴性菌强。Tiwari 和 Maxcy 对牛肉糜用 2.72kGy 剂量进行辐射处理后发现[79]：73%～75%的残存菌属于这些相关属中的菌。而在未经辐射处理的肉中，这些相关菌的数量只占菌相构成中的 8%左右。在这两个属中，莫氏杆菌的耐辐射能力要高于不动杆菌，它们的 D_{10}值分别为 5.39kGy 和 5.83kGy。而奥斯陆摩氏杆菌各菌株的 D_{10}值在 4.77～10kGy 之间。－80℃下时对存在于磷酸缓冲液中的几种非芽孢菌的辐射敏感性进行比较研究后，Anellis 等人发现：*Deinococcus radiodurans* 在 18kGy 剂量作用后还能存活，粪肠球菌菌株的存活剂量为 9～15kGy，粪渣肠球菌的存活剂量为 6～9kGy，而乳酸乳球菌在 6kGy 剂量下就不能存活。金黄色葡萄球菌、干酪乳杆菌、阿拉伯乳杆菌在 3kGy 剂量下就不能存活。实验结果表明：辐射敏感性随辐射温度的下降而降低，对芽孢菌也是如此。

经辐射选择性灭菌且在低温条件下贮藏的食品，导致其最终腐败的菌基本上是一种或一种以上的莫氏杆菌-不动杆菌或上面提到的乳酸菌。2.5kGy 剂量能杀灭牛肉糜中所有的假单胞菌、肠细菌和热死环丝菌，并可使 APCs 值由 lg6.18/g 降至 lg1.78/g，而乳酸菌只降低到 lg3.4/g[50]。

2～3kGy 剂量对水果进行辐射选择性灭菌处理，水果的货架期至少可延长 14d。至少有 6 个国家已批准对新鲜水果进行辐射选择性灭菌。其它好几个国家也准许对一些肉类、家禽和水产品进行辐射处理（表 14.5）。一般来说，在同样选择性灭菌条件下，货架期的延长，肉类和水产品要长于水果。这是因为在一般情况下，霉菌比革兰氏阴性菌更耐辐射，而后者是引起肉制品腐败的主要原因菌。

昆虫卵子和幼虫只需 1kGy 剂量就可被杀灭，猪肉绦虫的囊虫（*Taenia Solium*）和牛肉绦虫（*T. Saginata*）甚至可用更低的剂量加以杀灭，0.2～0.5kGy 剂量就可杀灭肉中感染的囊虫病寄生虫。

14.6 食品辐射的法律规范

1989 年 6 月，至少有 36 个国家批准对食品进行辐射灭菌，至少有 20 种不同食品包装材料已受美国 FDA 批准在 10kGy 或 60kGy 辐射剂量下使用。1983 年，FDA 批准通过香料和蔬菜调料的辐射剂量为 10kGy（1983 年 7 月 15 日，美国联邦公报）。1985 年，FDA 又批准通过猪肉的辐射剂量为 1kGy，以控制螺旋毛线虫（1985 年 7 月 22 日，美国联邦公报）。1986 年，泰国用最小剂量为 2.0kGy 的射线对发酵猪肉香肠（Nham）进行辐射处理，其产品在曼谷出售[12]。1986 年，用高达 1.0kGy 辐射剂量对 Puerto Rican 芒果进行辐射处理，其产品运往美国迈阿密市、佛罗里达州出售。1987 年，用 0.41～0.51kGy 辐射剂量处理夏威夷番木瓜以控制害虫。1990 年 5 月，USDA 批准家禽的辐射剂量可达 3.0kGy，并于 1993 年 9 月 2 日，在伊利诺依州的一家杂货店里第一次外售经辐射处理的家禽[13]。1987 年用 2.0kGy 辐射剂量处理过的草莓在法国里昂出售，1992 年 1 月 25 日，在美国的佛罗里达州也有这种草莓出售。1995 年，美国缅因州和纽约州撤销了禁售辐射食品的法律。在食品辐射的直接应用方面，应用最为广泛的领域仍是抑制发芽和杀灭寄生虫。

WHO 已批准 7kGy 辐射剂量为无条件安全剂量。20 世纪 70 年代早期，加拿大批准试验上市的鲜新鳕鱼和鳕鱼片的最大辐射剂量为 1.5kGy。1983 年，食品法规委员会建议的硬骨鱼及鱼制品的辐射剂量为 1.5kGy 或 2.2kGy[14]。在美国较大范围内批准食品辐射的一个障碍是定义辐射作用的方式。它只是加工的一个附加过程而非必需过程。这就是说辐射过的食品必须贴上标签。另一个值得关注的问题是肉毒梭状芽孢杆菌孢子的致死率（见后）。然而人们的另一个顾虑是经过辐射完全灭菌剂量处理后，非病原菌可能会变异为病原菌，或者说病原菌的毒性可能因此而提高。但到目前为止还没有证据可以证实这一现象的存在。

如果低酸性食品在不能使肉毒梭状芽孢杆菌孢子致死的剂量下进行辐射处理，这类食品就会出现安全性问题，尤其是在当它们的贮存条件允许该菌生长和产生毒素时。因为辐射完全杀菌可以杀死这些菌，因此这里考虑的只是在辐射针对性和选择性灭菌时可能出现的情况。对于鱼类辐射选择性灭菌，Giddings[15]指出低脂白鱼最适合辐射处理，而高脂鱼（如鲱鱼）就不太适宜进行辐射处理，因为这些鱼类有更多的产生肉毒素的条件。同时他还注意到：即使在辐射过的食用低脂白鱼中检出肉毒杆菌孢子，它们的数量也小于 1/g。

14.7 辐射对食品质量的影响

某些辐射食品中出现的一些不利的变化可能是由辐射直接引起的，或者是由过度辐射反应间接引起的。水的电离辐射分解按下式进行：

$$3H_2O \xrightarrow{\text{电离辐射}} H^+ + OH^- \cdot + H_2O_2 + H_2$$

另外，自由基是在初级电子轨道上形成的，扩散时自由基相互之间发生反应[11]。反

应形成的一部分产物沿轨道逃逸，与溶质分子反应。在没有空气的条件下进行辐射时，因缺乏 O_2 而不能形成过氧化物，从某种程度上说，可以使得变色和变味降低到最小的程度。减少变味最好的方法是在0℃以下辐射[77]。低于0℃可以降低或阻止辐射电离分解及随后产生反应物。降低对食物副作用的其它方法列于表 14.6。

表 14.6 降低电离辐射过程对食物副作用的方法[19]

方　法	原　因	方　法	原　因
降低温度	固定自由基	辐射、蒸馏同时进行	除去挥发性的变色、变味前体
降低氧气浓度	减少氧化自由基至活性分子的数量	降低辐射剂量	显而易见
加入自由基清除剂	清除剂竞争性争夺自由基		

注：摘自 Goldblith[19]。

除了水，食品中的蛋白质及其它含氮化合物对辐射似乎是最为敏感的。氨基酸、多肽和蛋白质辐射后的产物取决于辐射的剂量、温度、氧的数量、水分含量及其它因素。下面列出的是一些辐射后的产物：NH_3、H_2、CO_2、H_2S、氨基和羰基化合物。至于氨基酸，芳香族氨基酸比其它氨基酸对辐射更为敏感，并可发生环结构的改变。对辐射剂量敏感的氨基酸有：蛋氨酸、半胱氨酸、组氨酸、精氨酸和酪氨酸。对电子射线辐射最敏感的氨基酸是胱氨酸。Johnson 和 Moser [29]的研究结果表明，牛肉糜辐射后，这种氨基酸的损失率约为 50%，色氨酸的损失率为 10%，而其它氨基酸很少或没有遭到破坏。氨基酸在 γ-射线辐射下的稳定性高于电子束辐射后的稳定性。

几位研究人员的报道：辐射脂质和脂肪会产生羰基和其它诸如过氧化物等氧化产物，尤其是在有氧环境中进行辐射和（或）贮存时。脂肪在空气中经辐射后引起的最显著的感官质量变化是酸败味的形成。

从中看出，高剂量辐射会引起某些食物产生“辐射气味”，特别是肉类食品。Wick 等人[83]对生牛肉糜在室温下用 20～60kGy 剂量辐射后产生的挥发性成分进行了测定，发现了大量的风味物质。对其中 45 种或更多的组分进行鉴定：17 种是含硫化合物，14 种是碳氢化合物，9 种是碳基化合物，5 种或更多种是碱类和醇类化合物。辐射强度越大，产生的挥发性物质数量就越多。其中许多组分已在未经辐射的熟牛肉糜液中抽提、检出过。

至于 B 族维生素，Liuzzo 等人[41]发现，在剂量为 2～6kGy 之间的 ^{60}Co 辐射会破坏部分牡蛎中存在的下列 B 族维生素：硫胺素、烟酸、吡哆素、生物素和维生素 B_{12}。核黄素、泛酸、叶酸经辐射后含量反而有所增加，其原因可能是结合态维生素辐射后的分解。总之，对水溶性维生素的影响并不明显[74]。

辐射除了造成某些食品风味和气味发生改变外，辐射对水果和蔬菜的伤害作用也有过报道。其中最严重的问题是辐射引起植物的结构多糖果胶和纤维素的降解，从而导致这类产品的软化。Massey 和 Bourke 用辐射完全灭菌剂量验证了这一作用的存在[44]。辐射影响了苹果中的乙烯的合成，因此，经过辐射的苹果的成熟速度低于未经辐射的对照组。然而，对绿色柠檬却恰恰相反，辐射刺激乙烯合成，从而加快其成熟速度。

辐射产生的辐射离解产物是一些在培养基中呈抗菌活性的物质。但是，用 15kGy 辐射肉类，在肉中却没有发现有抗菌活性[10]。有关辐射食品的所有优点及其毒理学内容可见综述[67,74]。

14.8 辐射食品贮藏稳定性

对食品用辐射完全灭菌剂量进行电离辐射处理与用热力灭菌方法处理，其货架稳定期基本相同。但是就其对食品贮存稳定性而言，用这两种方法加工的食品之间存在两点不同之处：辐射完全灭菌不能破坏食品自身存在的酶系，这些酶在贮存时还可能起作用，另外还可能发生辐射过度而导致的各种变化。采用 45kGy 剂量和无活酶存在的鸡肉、培根、鲜肉和烤猪肉，Heiligman[27]发现产品的保质期可达 24 个月。而且 70℃贮藏的产品要比 37.8℃下贮藏更易让人接受。据 Licciardello 等人[40]的报道，经辐射处理的牛排、牛肉糜、猪肉香肠可在冰冻温度下贮存 12 年。这些食品与风味防腐剂一起包装，并用 10.8kGy 剂量进行辐射处理。据作者称：经 12 年贮藏后、肉的外观还相当不错。虽然存在轻微的辐射气味，但并未达到令人讨厌的程度。据报道：这些肉有强烈的苦味，据估计可能是由于酪氨酸结晶引起的。牛排中的游离氨基酸氮含量，辐射保藏前后分别为 75mg/100g 和 175mg/100g，而汉堡产品贮存前后游离氨基酸氮含量分别为 67mg/100g 和 160mg/100g。

经过辐射选择性灭菌处理的食物，如果贮存于适合微生物生长的温度之下，食物中残存的微生物会导致食品的最终腐败。水产品的正常腐败菌群对电离辐射相当敏感，用约 2.5kGy 的辐射剂量一般就可杀灭 99%的菌，辐射灭菌处理食品的最终腐败是由辐射处理后仍残存的少数微生物引起的。

若想进一步了解有关食品辐射各个方面，请参阅参考文献[60,78]。

14.9 微生物的耐辐射特性

对电离辐射最敏感的细菌是 G（－）杆菌，如假单胞菌；而摩氏杆菌和不动杆菌属中的一些球杆菌 G（－）菌又是 G（－）菌中抗性最强的菌。G（＋）球菌是非芽孢菌中抗性最强的菌，它包括微球菌、链孢球菌和肠球菌。决定一种菌是否比另一种菌对辐射更敏感或具更强的抗性，不仅仅与其基本生物学特性有关，而且还与用于食物保藏的辐射作用的方式有关。对抗性机理的更好把握有利于探索增强菌辐射敏感性的方法，从而降低达到保藏食品目的所需的辐射剂量。

有关氧化还原条件对磷酸缓冲液中 *Deinococcus radiodurans* 耐辐射性影响的研究结果列于表 14.7[12]中。与对照组相比，当在用 N_2 或 O_2 充入的缓冲液中进行试验时，菌对辐射的敏感性并没有明显的改变，用 100mg/kg 的 H_2O_2 也同样如此。如果用半胱氨酸（Cys）处理，可降低菌体细胞对辐射的敏感性，而抗坏血酸盐则能提高其敏感性。有关乙基丙酰胺（NEM）和引哚乙酸（LAA）对抗性影响的研究表明：LAA 能降低抗性，而 NEM 在不产生毒性的剂量下试验时无降低抗性的作用。O_2 的存在与否对这两种化合物

都没有影响。

表 14.7 氧化还原条件对 *Deinococcus radiodurans* 菌耐辐射性的影响

条件	残存部分 lg 值[a]	条件	残存部分 lg 值[a]
缓冲液、未经任何处理	3.11542	巯基乙酸盐 (0.01mol/L)	−1.98455
充入 O_2	−3.89762	半胱氨酸 (0.1mol/L)	0.80880
充入 N_2	−2.29335	抗坏血酸盐 (0.1mol/L)	−5.36050
H_2O_2 (100mg/kg)	−3.47710		

注：辐射后菌数减少值。条件：0.05mol/L 磷酸盐缓冲液，辐射剂量 (γ-射线)：10kGy，LSD；$P=0.05$ (1.98116)；$P=0.01$ (2.61533)。

[a] 4 次重复平均值。

14.9.1 耐性极强的菌种的生物学

目前已知的非芽孢菌中耐辐射性最强的有 *Deinococcus* 属中的 4 种菌和 *Deinobacter*、*Rubrobacter* 和不动杆菌属中各一种菌，这些种的一些特性列于表 14.8。*Deinococci* 最早是属于微球菌，但根据 16rRNA，它们又与 *Deinobacter* 和栖热菌属一样，成为含有 16SrRNA 10 个主要过汇藤属 (phyla) 中的一种[79,81,85]。*Deinococci* 通常成对或以四聚体形式出现，含有红色水溶性色素，最佳生长温度 30℃，胞壁质含碱性的 L-鸟氨酸 (不像微球菌，含赖氨酸 (Lys)，其特征是 (G+C)%在 62%～70%之间。它们不含胞壁酸。该属最不寻常的特点是还有细胞外膜 (outer membrane)，不像其它 G (+) 菌。这点作为古系统 G (−) 菌群划分依据[9]。

表 14.8 极度耐辐射非芽孢菌

菌 体	革兰氏阳阴性	形态	色素	外膜	主要的异戊间二烯醌	DNA 的 (G+C)%	最适生长温度/℃	黏肽中的碱性氨基酸	辐射 D 值/kGy
Deinococcus radiodurans	+	C	R	−	MK-8	67	30	L-orn	
D. radiophilus	+	C	R	−	MK-8	62	30	L orn	
D. proteolyticus	+	C	R	+	MK-8	65	30	L orn	
D. radiopugnans	−	C	R	+	MK-8	70	30	L orn	
Deinobacter grandis	−	R	R/P	+	MK-8	69	30～35	Orn	1.0
抗辐射不动杆菌	−	C	R	ND[a]	Q-9	44.1 44.8	27～31	ND	1.25～2.2
Rubrobacter radiotolerans	+	R	R	ND	MK-8	67.9	46～48	L lys	1.0

[a] 没检测。

Deinococci 的其它特别之处是菌体中含有棕榈酸酯 (16：1)，占细胞膜脂肪酸构成的 60%，为细胞脂肪酸总量的约 25%。脂肪酸含量高是 G (−) 菌的另一主要特征。质膜

上主要的异戊间二烯醌是一种甲基奈醌类化合物，甲基奈醌类是由两个萜醌基团组成，这些基团参与电子传递、氧化磷酸化，也可能参与营养物质的主动输送[8]。C-3 异戊二烯端链的长度是 1～14 个异丁二烯单位（MK），*Deinococci* 还含有 MK-8，这点与某些微球菌、游动球菌、葡萄球菌和肠球菌一样[8]。*Deinococci* 的磷脂中不含磷乙酰甘油酯或二磷乙酸甘油酯，取而代之的是磷酸糖酯作为其主要成分。

Deinobacter 菌属除了是 G（－）杆菌外，其它许多特征与 *Deinococcal* 相似。*Rubrobacter ridiotolerans* 是 G（＋）杆菌，与 *Deinococcl* 非常相似，其胞壁质中的碱性氨基酸是 L-赖氨酸，而不是 L-鸟氨酸。耐辐射不动杆菌（*Acietobacter radioresistens*）是一种 G（－）球杆菌，与 *Deinococci* 有好几方面不同，其 DNA（G＋C）%在 44.1%～44.8%之间，主要的异戊二烯醌是 Q-9，而不是 MK-8。

从牛肉糜、猪肉香肠、动物皮、溪水[36]以及黑斑鳕中已分离得到 *Deinococci* 菌。据报道，*Deinococci* 存在于粪便、锯屑和空气中。从动物粪便和淡水鱼中已分离得到 *Deinobacter*，从日本的一个具放射性的温泉中分离得到 *Rubrobacter*，从棉花和土壤中分离得到 *A. radioresistens*。

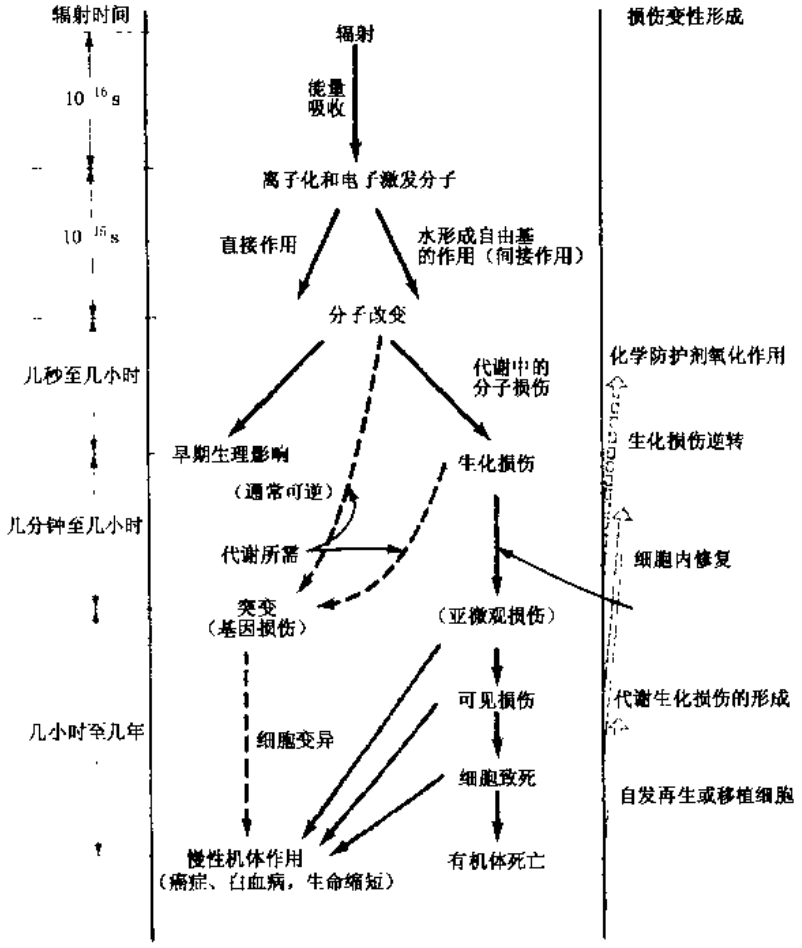


图 14.4　有机体的辐射和辐射过量综述

（摘自 Bacq 和 Alexander）

表 14.8 中提及的 7 个菌种都是需氧的，过氧化氢酶反应呈阳性，而且一般不能分解生化试验的反应底物。*Deinococci* 含有多种胡萝卜素，从细胞质膜中分离得到的类胡萝卜素呈亮红色 。

非 *Deinococcal* 菌种的辐射，*D* 值在 1.0～2.2kGy 之间，而 *Deinococci* 的许多菌株却能在 15kGy 下存活。*D. radiophilus* 是耐辐射性最强的一种。

14.9.2 耐辐射性的各种机制

对这些菌种的耐辐射性的确切机理尚不清楚。但已观察到了 *Deinococci* 的抗脱水的性能极强，并认为这与耐辐射性有关。这些菌复杂的细胞膜构成也许是一个影响因子，但现在还缺乏准确的实验验证数据，所有这些菌均有高色素形成能力，并含各种类胡萝卜素，这也可能与耐辐射性有某种相关性。但是，已证实在 *D. radiophilus* 的耐性方面，这些色素并没起任何作用[33,38]。辐射后在细菌中发生的化学反应见图 14.4。水的辐射电离形成了自由基和过氧化物，对辐射敏感的菌似乎不能克服这些不利的影响。含—SH 基团的化学物质似乎有防辐射作用，但它们在细菌的抗辐射方面究竟起什么作用，现在还不清楚。

有效的核酸修复机理是耐性极强的一方面原因，*D. radiodurans* 对辐射损伤的酶修复功能已得到证实[47]。*D. radiophilus* 也被证实具有有效的核酸切除、修复系统[36]。

参 考 文 献

[1] Andrews, L. S., D. L. Marshall, and R. M. Grodner. 1995. Radiosensitivity of *Listeria monocytogenes* at various temperatures and cell concentrations. *J. Food Protect.* 58: 748～751.

[2] Anellis, A., D. Berkowitz, and D. Kemper. 1973. Comparative resistance of nonsporogenic bacteria to low-temperature gamma irradiation. *Appl. Microbiol.* 25: 517～523.

[3] Anellis, A., D. Berkowitz, W. Swantak, and C. Strojan. 1972. Radiation sterilization of prototype military foods: Low-temperature irradiation of codfish cake, corned beef, and porksausage. *Appl. Microbiol.* 24: 453～462.

[4] Anellis, A., E. Shattuck, D. B. Rowley, E. W. Ross, Jr., D. N. Whaley, and V. R. Dowell, Jr. 1975. Low-temperature irradiation of beef and methods for evaluation of a radappertization process. *Appl. Microbiol.* 30: 811～820.

[5] Bacq, Z. M., and P. Alexander. 1961. *Fundamentals of Radiobiology*, 2d ed. Oxford: Pergamon.

[6] Brooks, B. W., and R. G. E. Murray. 1981. Nomenclature for "*Micrococcus radiodurans*" and other radiation-resistant cocci: *Deinococcaceae* fam. nov. and *Deinococcus* gen. nov., including five species. *Int. J. System. Bacteriol.* 31: 353～360.

[7] Clifford, W. J., and A. Anellis. 1975. Radiation resistance of spores of some *Clostridium perfringens* strains. *Appl. Microbiol.* 29: 861～863.

[8] Collins, M. D., and D. Jones. 1981. Distribution of isoprenoid quinone structural types in bacteria and their taxonomic implications. *Microbiol. Rev.* 45: 316～354.

[9] Counsell, T. J., and R. G. E. Murray. 1986. Polar lipid profiles of the genus *Deinococcus*. *Int. J. System. Bacteriol.* 36: 202～206.

[10] Dickson, J. S., and R. B. Maxcy. 1984. Effect of radiolytic products on bacteria in a food system. *J. Food Sci.* 49: 577～580.

[11] Doty, D. M. 1965. Chemical changes in irradiated meats. In *Radiation Preservation of Foods*, 121～25. Washington, DC: National Research Council, National Academy of Sciences.

[12] Duggan, D. E., A. W. Anderson, and P. R. Elliker. 1963. Inactivation of the radiation-resistant spoilage bacterium *Micrococcus radiodurans*. II. Radiation inactivation rates as influenced by menstruum temperature, preirradiation heat treatment, and certain reducing agents. *Appl. Microbiol.* 11: 413～417.

[13] Ehioba, R. M., A. A. Kraft, R. A. Molins, H. W. Walker, D. G. Olson, G. Subbaraman, and R. P. Skowronski. 1988. Identification of microbial isolates from vacuum-packaged ground pork irradiated at 1 kGy. *J. Food. Sci.* 53: 278～279, 281.

[14] El-Zawahry, Y. A., and D. B. Rowley. 1979. Radiation resistance and injury of *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 50～54.

[15] Fiddler, W., R. A. Gates, J. W. Pensabene, J. G. Phillips, and E. Wierbicki. 1981. Investigations on nitrosamines in irradiation-sterilized bacon. *J. Agric. Food Chem.* 29: 551～554.

[16] Food and Agriculture Organization/IAEA/World Health Organization. 1977. *Wholesomeness of Irradiated Food*. Report of joint FAO/IAEA/WHO Expert Committee, WHO Technical Report Series 604.

[17] Fu, A.-H., J. G. Sebranek, and E. A. Murano. 1995. Survival of *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, and *Escherichia coli* 0157: H7 and quality changes after irradiation of beef steaks and ground beef. *J. Food Sci.* 60: 972～977.

[18] Giddings, G. G. 1984. Radiation processing of fishery products. *Food Technol.* 38 (4): 61～65, 94～97.

[19] Goldblith, S. A. 1963. Radiation preservation of foods—Two decades of research and development. In *Radiation Research*, 155～167. Washington, DC: U. S. Department of Commerce, Office of Technical Services.

[20] Goldblith, S. A. 1966. Basic principles of microwaves and recent developments. *Adv. Food Res.* 15: 277～301.

[21] Goresline, H. E., M. Ingram, P. Macuch, G. Mocquot, D. A. A. Mossell, C. F. Niven, and F. S. Thatcher. 1964. Tentative classification of food irradiation processes with microbiological objectives *Nature* 204: 237～238.

[22] Grecz, N., O. P. Snyder, A. A. Walker, and A. Anellis. 1965. Effect of temperature of liquid nitrogen on radiation resistance of spores of *Clostridium botulinum*. *Appl. Microbiol.* 13: 527～536.

[23] Grecz, N., A. A. Walker, A. Anellis, and D. Berkowitz. 1971. Effects of irradiation temperature in the range-196 to 95 C on the resistance of spores of *Clostridium botulinum* 33A in cooked beef. *Can J. Microbiol.* 17: 135～142.

[24] Grünewald, T. 1961. Behandlung von Lebensmitteln mit energiereichen Strahlen. *Ernährungs-Umschau* 8: 239～244.

[25] Hashisaka, A. E., S. D. Weagant, and F. M. Dong. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in mozzarella cheese and ice cream exposed to gamma irradiation. *J. Food Protect.* 52: 490～492

[26] Hashisaka, A. E., J. R. Matches, Y. Batters, F. P. Hungate, and F. M. Dong. 1990. Effects of gamma irradiation at -78℃ on microbial populations in dairy products. *J. Food Sci.* 55: 1284～

1289.

[27] Heiligman, F. 1965. Storage stability of irradiated meats. *Food Technol.* 19: 114～116.

[28] Huhtanen, C. N., R. K. Jenkins, and D. W. Thayer. 1989. Gamma radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 52: 610～613.

[29] Johnson, B., and K. Moser. 1967. Amino acid destruction in beef by high energy electron beam irradiation. In *Radiation Preservation of Foods*. 171～179. Washington, DC: American Chemical Society.

[30] Josephson, E. S., A. Brynjolfsson, and E. Wierbicki. 1975. The use of ionizing radiation for preservation of food and feed products. In *Radiation Research—Biomedical, Chemical, and Physical Perspectives*, ed. O. F. Nygaard, H. I. Adler, and W. K. Sinclair, 96～117. New York: Academic Press.

[31] Kampelmacher, E. H. 1983. Irradiation for control of *Salmonella* and other pathogens in poultry and fresh meats. *Food Technol.* 37 (4): 117～119, 169.

[32] Kempe, L. L. 1965. The potential problems of type E botulism in radiation-preserved seafoods. In *Radiation Preservation of Foods*, 211～215. Washington, DC: Research Council, National Academy of Science.

[33] Kilburn, R. E., W. D. Bellamy, and S. A. Terni. 1958. Studies on a radiation-resistant pigmented Sarcina sp. *Radiat. Res.* 9: 207～215.

[34] Koch, H. W., and E. H. Eisenhower. 1965. Electron accelerators for food processing. In *Radiation Preservation of Foods*. 149～180. Washington, DC: National Research Council, National Academy of Science.

[35] Krabbenhoft, K. L., A. W. Anderson, and P. R. Elliker. 1965. Ecology of *Micrococcus radiodurans*. *Appl. Microbiol.* 13: 1030～1037.

[36] Lavin, M. F., A. Jenkins, and C. Kidson. 1976. Repair of ultraviolet light-induced damage in *Micrococcus radiophilus*, an extremely resistant microorganism. *J. Bacteriol.* 126: 587～592.

[37] Lee, J. S., A. W. Anderson, and P. R. Elliker. 1963. The radiation-sensitizing effects of Nethylmaleimide and iodoacetic acid on a radiation-resistant *Micrococcus*. *Radiat. Res.* 19: 593～598.

[38] Lewis, N. F., D. A. Madhavesh, and U. S. Kumta. 1974. Role of carotenoid pigments in radioresistant micrococci. *Can. J. Microbiol.* 20: 445～459.

[39] Ley, F. J. 1983. New interest in the use of irradiation in the food industry. In *Food Microbiology: Advances and Prospects*, ed. T. A. Roberts and F. A. Skinner, 113～129. London: Academic Press.

[40] Licciardello, J. J., J. T. R. Nickerson, and S. A. Goldblith. 1966. Observations on radiopasteurized meats after 12 years of storage at refrigerator temperatures above freezing. *Food Technol.* 20: 1232

[41] Liuzzo, J. S., W. B. Barone, and A. F. Novak. 1966. Stability of B-vitamins in Gulf oysters preserved by gamma radiation. *Fed. Proc.* 25: 722.

[42] Loaharanu, P. 1989. International trade in irradiated foods: Regional status and outlook. *Food Technol.* 43 (7): 77～80.

[43] Losty, T., J. S. Roth, and G. Shults. 1973. Effect of irradiation and heating on proteolytic activity of meat samples. *J. Agr. Food Chem.* 21: 275～277.

[44] Messey, L. M., Jr., and J. B. Bourke. 1967. Some radiation-induced changes in fresh fruits and vegetables. In *Radiation Preservation of Foods*, 1～11. Washington, DC: American Chemical

Society.

[45] Maxie, E., and N. Sommer. 1965. Irradiation of fruits and vegetables. In *Radiation Preservation of Foods*, 39～52. Washington, DC: National Research Council, National Academy of Science.

[46] Midura, T. F., L. L. Kempe, J. T. Graikoski, and N. A. Milone. 1965. Resistance of *Clostridium perfringens* type A spores to gamma radiation. *Appl. Microbiol.* 13: 214～247.

[47] Moseley, B. E. B. 1976. Photobiology and radiobiology of *Micrococcus* (*Deinococcus*) *radiodurans*. *Photochem. Photobiol. Rev.* 7: 223～274.

[48] Mulder, R. W. A. W. 1984. Ionizing energy treatment of poultry. *Food Technol. Aust.* 36: 418～420.

[49] Mulder, R. W. A., S. Notermans, and E. H. Kampelmacher. 1977. Inactivation of salmonellae on chilled and deep frozen broiler carcasses by irradiation. *J. Appl. Bacteriol.* 42: 179～185.

[50] Niemand, J. G., H. J. van der Linde, and W. H. Holzapfel. 1983. Shelf-life extension of minced beef through combined treatments involving radurizatio. *J. Food Protect.* 46: 791～796.

[51] Nishimura, Y., T. Ino, and H. Iizuka. 1988. *Acinetobacter radioresistens* sp. nov. isolated from cotton and soil. *Int. J. System. Bacteriol.* 38: 290～311.

[52] Niven, C. F., Jr. 1958. Microbiological aspects of radiation preservation of food. *Ann. Rev. Microbiol.* 12: 507～524.

[53] Novak, A. F., R. M. Grodner, and M. R. R. Rao. 1967. Radiation pasteurization of fish and shellfish. In *Radiation Preservation of Foods*, 142～151. Washington, DC: American Chemical Society.

[54] Oyaizu, H., E. Steckebrandt, K. H. Schleifer, W. Ludwig, H. Pohla, H. Ito, A. Hirata, Y. Oyaizu, and K. Komagata. 1987. A radiation-resistant rod-shaped bacterium, *Deinobacter grandis* gen. nov., sp. nov., with peptidoglycan containing ornithine. *Int. J. System. Bacteriol.* 37: 62～67.

[55] Palumbo, S. A., R. K. Jenkins, R. L. Buchanan, and D. W. Thayer. 1986. Determination of irradiation D-values for *Aeromonas hydrophila*. *J. Food Protect.* 49: 189～191.

[56] Patterson, M. 1989. Sensitivity of *Listeria monocytogenes* to irradiation on poultry meat and in phosphate-buffered saline. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 181～184.

[57] Patterson, M. F. 1988. Sensitivity of bacteria to irradiation on poultry meat under various atmospheres. *Lett. Appl. Microbiol.* 7: 55～58.

[58] Poole, S. E., P. Wilson, G. E. Mitchell, and P. A. Wills. 1990. Storage life of chilled scallops treated with low dose irradiation. *J. Food Protect.* 53: 763～766.

[59] Pszczola, D. 1993. Irradiated poultry makes U. S. debut in midwest and Florida markets. *Food Technol.* 47 (11): 89～96.

[60] Radomyski, T., E. A. Murano, D. G. Olson, and P. S. Murano. 1994. Elimination of pathogens of significance in food by low-dose irradiation: A review. *J. Food Protect.* 57: 73～86.

[61] Restaino, L., J. J. J. Myron, L. M. Lenovich, S. Bills, and K. Tscherneff. 1984. Antimicrobial effects of ionizing radiation on artificially and naturally contaminated cacao beans. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 886～887.

[62] Roberts, T. A., and M. Ingram. 1965. The resistance of spores of *Clostridium botulinum* Type E to heat and radiation. *J. Appl. Bacteriol.* 28: 125～141.

[63] Roberes, T. A., and M. Ingram. 1965. Radiation resistance of spores of *Clostridium* species in

aqueous suspension. *J. Food Sci.* 30: 879～885.

[64] Rose, S. A., N. K. Modi, H. S. Tranter. N. E. Bailey, M. F. Stringer, and P. Hambleton. 1988. Studies on the irradiation of toxins of *Clostridium botulinum* and *Staphylococcus aureus*. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 223～229.

[65] Rowley, D. B., and A. Brynjolfsson. 1980. Potential uses of irradiation in the processing of food. *Food Technol.* 34 (10): 75～77.

[66] Saleh, Y. G., M. S. Mayo, and D. G. Ahearn. 1988. Resistance of some common fungi to gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2134～2135.

[67] Skala, J. H., E. L. McGown, and P. P. Waring. 1987. Wholesomeness of irradiated foods. *J. Food Protect.* 50: 150～160.

[68] Sullivan, R., A. C. Fassolitis, E. P. Larkin, R. B. Read, Jr., and J. T. Peeler. 1971. Inactivation of thirty viruses by gamma radiation. *Appl. Microbiol.* 22: 61～65.

[69] Sullivan, R., P. V. Scarpino, A. C. Fassolitis, E. P. Larkin, and J. T. Peeler. 1973. Gamma radiation inactivation of coxsackievirus B-2. *Appl. Microbiol.* 26: 14～17.

[70] Suzuki, K. -I., M. D. Collins, E. Iigima, and K. Komagata. 1988. Chemotaxonomic characterization of a radiotolerant bacterium, *Arthrobacter radiotolerans*: Description of *Rubrobacter radiotolerans* gen. nov., comb. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 52: 33～40.

[71] Thayer, D. W., G. Boyd, and C. N. Huhtanen. 1995. Effects of ionizing radiation and anaerobic refrigerated storage on indigenous microflora, *Salmonella*, and *Clostridium botulinum* types A and B in vacuum-canned, mechanically deboned chicken meat. *J. Food Protect.* 58: 752～757.

[72] Thayer, D. W., and G. Boyd. 1995. Radiation sensitivity of *Listeria monocytogenes* on beef as affected by temperature. *J. Food Sci.* 60: 237～240.

[73] Thayer, D. W., J. B. Fox, Jr., and L. Lakritz. 1991. Effects of ionizing radiation on vitamins. In *Food Irradiation*, ed. S. Thorne. 285～325. New York: Elsevier Applied Science.

[74] Thayer, D. W., J. P. Christopher, L. A. Campbell, D. C. Ronning, R. R. Dahlgren, G. M. Thomson, and E. Wierbicki. 1987. Toxicology studies of irradiation-sterilized chicken. *J. Food Protect.* 50: 278～288.

[75] Tiwari, N. P., and R. B. Maxcy. 1972. *Moraxella-Acinetobacter* as contaminants of beef and occurrence in radurized product. *J. Food Sci.* 37: 901～903.

[76] Tsuji, K. 1983. Low-dose cobalt 60 irradiation for reduction of microbial contamination in raw materials for animal health products. *Food. Technol.* 37 (2): 48～54.

[77] Urbain, W. M. 1965. Radiation preservation of fresh meat and poultry. In *Radiation Preservation of Foods*, 87～98. Washington, DC: National Research Council, National Academy of Science.

[78] Urbain, W. M. 1978. Food irradiation. *Adv. Food Res.* 24: 155～227.

[79] Van den Eynde, H., Y. Van de Peer, H. Vandenabeele, M. Van Bogaert, and R. de Wachter. 1990. 5S rRNA sequences of myxobacteria and radioresistant bacteria and implications for eubacterial evolution. *Int. J. System. Bacteriol.* 40: 399～404.

[80] Verster, A., T. A. du Plessis and L. W. van den Heever. 1977. The eradication of tapeworms in pork and beef carcasses by irradiation. *Radiat. Phys. Chem.* 9: 769～771.

[81] Weisburg, W. G., S. J. Giovannoni, and C. R. Woese 1989. The *Deinococcus-Thermus* phylum and the effect of rRNA composition on phylogenetic tree construction. *System. Appl. Microbiol.* 11: 128～134.

[82] Welch, A. B., and R. B. Maxcy. 1975. Characterization of radiation-resistant vegetative bacteria in beef. *Appl. Microbiol.* 130: 242～250.

[83] Wick, E., E. Murray, J. Mizutani and M. Koshika. 1967. Irradiation flavor and the volatile components of beef. In *Radiation Preservation of Foods*, 12～25. Washington, DC: American Chemical Society.

[84] Wierbicki, E., M. Simon, and E. S. Josephson. 1965. Preservation of meats by sterilizing doses of ionizing radiation. In *Radiation Preservation of Foods*, 383～409. Washington, DC: National Research Council, National Academy of Science.

[85] Woese, C. R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51: 221～271.

15. 食品低温保藏及适冷菌的特性

利用低温保藏食品的原理是：在低温区域，当温度高于冰点时，食品微生物的生长速率减缓；而在冰点以下时，一般微生物都停止生长。其原因是：所有微生物新陈代谢的反应都需要酶的催化，而酶催化反应的速率依赖于温度。温度升高，反应速率也加快。温度系数（Q_{10}）通常可以定义为：

$$Q_{10}=\frac{\text{（设定温度 + 10℃）的反应速率}}{\text{某一设定温度下的反应速率}}$$

大多数微生物体系的温度系数（Q_{10}）在1.5～2.5之间，所以在合适的温度区域内，温度每升高10℃，反应速率提高2倍。反之，则相反。因为低温保藏食品的基本机理是低温对腐败微生物的作用，因此，下面的内容主要集中讨论低温对引起食品腐败的微生物的作用。然而必须清楚温度与相对湿度有关，冰点以下的温度不但影响R.H，而且还影响pH及其它一些影响微生物生长的参数。

15.1 定义

“嗜冷菌”（Psychrophile）这一术语是在1902年由Schmidt Nielsen首先提出的，当时是指在0℃下可以生长的微生物[130]。这个术语现在的定义是：在0～20℃下可以生长、最适生长温度为10～15℃的那些微生物[44]。大约在20世纪60年代，“适冷菌”（Psychrotroph）被用来指可以在5℃或更低温度下生长的微生物[1,47]。现在在食品微生物专家中被广泛接受的适冷菌的概念是：0～7℃下能够生长，并在7～10d内产生可见菌落的微生物。因为一些适冷菌甚至可以在温度高达43℃下生长，所以事实上这些菌应是嗜中温菌。根据这些定义，嗜冷菌应只生长在来自海水或极冷区域的产品中。在0～5℃范围内导致肉、家禽和蔬菜腐败的微生物可被认为是适冷菌。

因为所有的适冷菌在0～7℃范围内其生长速度并不一致，由此出现了兼性适冷菌（eurypsychrotroph）和专性适冷菌（stenopsychrotroph）这两个概念。典型的兼性适冷菌一般在6～10d才形成可见菌落；典型的专性适冷菌在5d左右可形成可见菌落[43]。因此，有人建议：可以通过观察在非选择性培养基上，43℃下培养24h是否生长来区别适冷菌和非适冷菌，后者可以生长[47]。实验中发现，有些菌如阴沟肠细菌、蜂房哈夫尼菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌（ATCC27739）[33]既可在10d内于7℃下良好生长，也可在43℃下良好生长，这类微生物可命名为兼性适冷菌。尽管兼性适冷菌中的一些其它菌在10d内于7℃下生长并不良好，但在43℃下却生长良好。典型的专性适冷菌是霉实假单胞菌和嗜水气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*），它们在7℃下生长3～5d就非常旺盛，而在40℃下不能生长[33]。

食品的低温保藏有三个明显的温度区域：冷却温度是指介于通常的冷藏箱温度（5～

7℃）和室温之间的温度，通常约为10～15℃，该温度区域适于一些果蔬，如黄瓜、西红柿、酸橙等的贮藏；冷藏温度介于0～7℃之间；冷藏温度是指低于－18℃的温度区域。在正常情况下，在冻藏温度下所有微生物的生长都被抑制，然而，一些菌确实可以在冻藏温度区域内生长，但其生长速度非常缓慢。

15.2 最低生长温度

在低于7℃下生长的细菌大多数是革兰氏阴性菌，但也有少量的革兰氏阳性菌（表15.1和表15.2）。在食品中微生物生长的最低温度纪录是－34℃，是一种红色酵母。酵母菌和霉菌比细菌更有可能在低于0℃下生长，这与真菌能在低水分活度下生长的情况相一致。细菌也有在－20℃和－12℃左右生长的记录[43]。在低于0℃下，微生物可能在诸如浓缩果汁、培根、冰淇淋和某些水果中生长。这是因为这类食品中含有抗冻结物质，降低了水的冰点。

表15.1　　低于7℃下可生长的细菌

革兰氏阴性菌	相对数量	革兰氏阳性菌	相对数量
不动细菌	××	芽孢杆菌	××
气单胞菌	××	短杆菌	×
产碱杆菌	×	环丝菌	×××
Alteromonas	××	肉食杆菌	×××
Cedecea	×	梭状芽孢杆菌	××
色杆菌	×	棒状杆菌	×
柠檬酸细菌	×	*Deinococcus*	×
肠细菌	××	肠球菌	×××
欧氏植病杆菌	××	库特氏菌（*Kurthia*）	×
埃希氏杆菌	×	乳酸杆菌	××
黄杆菌	××	乳酸链球菌	××
盐杆菌	×	明串珠菌	×
哈夫尼菌	××	李斯特菌	××
克氏杆菌	×	微球菌	××
摩氏杆菌	××	片球菌	×
Morganella	×	丙酸杆菌	×
发光杆菌	×	漫游球菌	××
Pantoea	××		
变形杆菌	×		
普罗威登斯菌	×		

续表

革兰氏阴性菌	相对数量	革兰氏阳性菌	相对数量
假单胞菌	×××		
Psychrobacter	××		
沙门氏菌	×		
赛氏杆菌	××		
Shewanella	×××		
弧菌	×××		
耶尔森氏菌	××		

注：作为适冷菌其相对重要性和优势性标志：×＝较次的；××＝中间；×××＝非常重要和有优势。

表 15.2　　在 7 ℃下可以生长的一些食品污染微生物的最低生长温度

种/株	最低生长温度/℃	评语
红酵母	−34	
红酵母[12]	−18	
未鉴定的霉菌	12	
弧菌	−5	真正的嗜冷菌
小肠结肠炎耶尔森氏菌	2	
未鉴定的大肠杆菌	2	
热死环丝菌	−0.8	7d 内；4℃，10d 内
肠球菌	0	不同的种或株
嗜水气单胞菌	−0.5	
肉明串珠菌	1.0	
L. gelidum	1.0	
单核细胞增生李斯特氏菌	1.0	
明串珠菌	2.0	12d 内
清酒（沙琪）乳酸杆菌	2.0	12d 内；4℃，10d 内
肉毒梭状芽孢杆菌 B、E、F 型	3.3	
Pantoea agglomerans	4.0	
巴拿马沙门氏菌	4.0	4 周内
介凝赛氏杆菌	4.0	
副溶血性弧菌	5.0	
海德堡沙门氏菌	5.3	
片球菌	6.0	8d 内微弱生长
短乳杆菌	6.0	8d 内

续表

种/株	最低生长温度/℃	评语
W. viridescens	6.0	8d 内
伤寒沙门氏菌	6.2	
金黄色葡萄球菌	6.7	
肺炎杆菌	7.0	
芽孢杆菌	7.0	520 种中的 165 种/株
沙门氏菌	7.0	109 种中的 65 种，4 星期内

15.3 冻藏食品的预处理

冻结前，冻藏蔬菜的预处理包括挑选、分类、清洗、热烫和包装。任何可察觉的腐烂必须加以剔除。肉、家禽、水产品、蛋和其它食品要尽可能新鲜。

热烫可通过将食品浸于热水中或使用蒸汽来完成，它的主要功能有：

①使在冷藏过程中可能导致不利变化的酶失活；

②增强或固定某些蔬菜的绿色；

③降低食品中微生物的数量；

④软化组织，有利于叶用蔬菜的包装；

⑤去除植物组织中的空气。

采用热烫的方法取决于产品种类、包装的尺寸和其它相关的参数。当使用热水热烫时，注意热烫用水的卫生质量，防止细菌孢子的积累以至于污染食品，是十分重要的。高达 99%的原始细菌量是通过热烫而去除的。大多数细菌营养细胞可在乳的巴氏杀菌温度（62.8℃，30min）下被杀死。对大多数引起蔬菜腐烂的主要菌尤其如此。虽然杀灭微生物不是热烫的主要目的，但破坏大多数食品中酶类所需的温度，也足以有效地杀灭细菌的营养细胞。

15.4 食品的冷冻和冷冻效果

使食品冷冻的两种基本方法是快速冷冻和慢速冷冻。快速冷冻或急冻是指食品的温度在 30min 内降至大约－20℃的过程。急冻可以通过制冷剂与食品间接接触或将食品直接浸于制冷剂中，并使用冷空气吹过被冷冻食品表面的方法加以实现。

缓冻是指食品在 3～72h 内达到所要求温度的过程。这与使用家用冰箱进行冷冻的类型基本一致。

从产品质量的观点看，快速冷冻比缓冻的优点更多。两种方法的比较结果如下：

速冻	缓冻
形成小的冰晶体	形成大的冰晶体
抑制或破坏代谢	破坏代谢关系（协调性）

短时集中经历各种不利的因素中	长时经历不利的或有害的因素中
对低温无适应过程	逐渐地适应
热休克（thermal shock）	无休克作用
无保护作用	浓缩溶质的积累有有利的效果
微生物冷冻成为冰晶体	
避免相互间的代谢不平衡	

有关冷冻过程中冰晶体的形成，缓冷趋向于形成大的、细胞间的冰晶体，而快速冷冻趋于形成小的、细胞内的冰晶体。冰晶体的生长是限制某些食品冷冻保质期的因素之一，因为随着冰晶体逐渐增大，动、植物产品的细胞会因细胞膜、细胞壁及内部构成的破坏而受损，至某种程度时，其解冻产品在组织结构和风味上都会与原产品有大的差异。在冷冻食品的解冻过程中，在同样的解冻时间内，慢速冷冻食品比快速冷冻食品更易失去汁液。形成小的冰晶体对冷冻食品质量的所有益处也可以从食品在冷冻过程中所发生的变化中体现出来。在食品的冷冻过程中，水从溶液中析出形成大小不一但纯度很高的冰晶体[16]。另外，食品冷冻过程中也伴随着各种性质的变化，例如：pH、滴定酸度、离子强度、黏度、渗透压、蒸汽压、冰点、表面和介面张力及氧化-还氧（O/K）电位等（见下述）。

15.5 冷冻食品的贮存稳定性

大量研究表明：大量的微生物可以在0℃或0℃以下的温度区域中生长。这些微生物能在冰点或冰点以下生长的原因除了自身因素外，还取决于营养成分、pH及可利用的液态水等外部条件。当温度降至冰点以下时，食品的A_w会降低。温度和水及冰的A_w之间的关系列子表15.3。在0℃下，水的A_w是1.0，在－20℃时降至约0.8；－50℃时为0.62左右。在冰点以下生长的微生物必须能在降低的A_w水平下生长，除非食品的成分使A_w向有利于微生物生长的方向改变。例如在糖含量相当高的浓缩果汁中，糖的存在使低温下果汁的A_w比在纯水情况下的更高，使微生物可在冰点以下生长。在培养基中加入甘油也可得到同样的效果。所有食品的冰点是不一样的（见图15.1）。一种食品的冰点在很大程度上取决于溶质组分的性质及其中那些使冰点下降成分的相对含量。

虽然在冷藏温度下所有微生物的代谢活性都已停止，但如果要求解冻的冷冻食品保持原有的风味和质构，其冷藏期是有限的。大多数冷冻食品都有一定的冷藏期。冷冻食品最长保存期的确定并不是取决于这些食品的微生物特性，而是取决于在解冻及随后的烹调中表现出来的诸如质构、风味、柔韧性、色泽及营养成分的保存等方面因素。

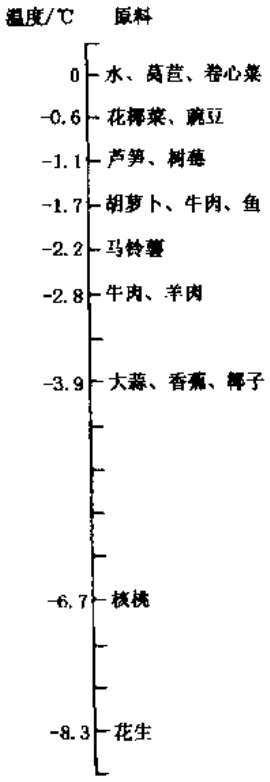


图15.1 一些食品的冰点[9]

一些包装不合理的食品在冷藏过程中会发生冷冻腐烂，以诸如鸡肉表皮等浅色食品的褐变为特征。褐变由表面水分的失去引起，并使产品褐变处的质地比原来的更为疏松。这种反应是不可逆的，并且已知它对某些生或熟的水果、家禽、肉和鱼等都有影响。

表 15.3　　不同温度下水和冰的蒸汽压

温度/℃	水的蒸汽压/Pa	冰的蒸汽压/Pa	$A_w=p_{冰}/p_{水}$
0	610.481	610.481	1.00
−5	421.697	401.699	0.953
−10	285.509	259.978	0.907
15	191.450	165.453	0.864
−20	125.727	103.458	0.822
−25	80.926	63.461	0.784
−30	51.062	38.130	0.750
-40	18.932	12.932	0.680
-50	6.399	4.000	0.620

15.6　冷冻对微生物的影响

因为某些微生物不能在冷冻温度下生长，因此冷冻是保存微生物菌种的方法之一，而冷冻干燥又可能是已知的最好的菌体保存方法。然而，已证实冷冻温度对食品中一些重要的微生物有杀灭作用。Ingram[31]综述了某些微生物在冷冻过程中所发生的一些主要变化：

①在冷冻过程中有微生物的突然死亡，情况随品种而变；

②经过冷冻后存活的这部分微生物在冷冻状态下贮存时会逐渐死亡；

③微生物的死亡速率刚好在冰点以下，尤其是−2℃左右时相对最快，但在最低温度下死亡速率反而降低，在低于−20℃时通常很慢。

冷冻后细菌的存活率随种类不同而不同，球菌对冷冻的抵抗力通常要比革兰氏阴性杆菌强得多。在引起食物中毒的细菌中，金黄色葡萄球菌或梭状芽孢杆菌的营养细胞比沙门氏菌有更大的抵抗力，然而低温对芽孢及引起食物中毒的毒素几乎没有作用[22]。将一些沙门氏菌的菌种冻至 -25.5℃，并保持 270d，其冷冻作用的效果见表 15.4。虽然对大多数菌种，在 270d 贮存期后，活菌数有明显的降低，但无一例发生沙门氏菌的全部死亡。

从严格的食品保藏观点来讲，冷冻不能为作为一种杀灭食品污染菌的手段。在此过程中，微生物失活的类型，株与株之间是不同的，它取决于采用的冷冻方法、食品的构成对微生物的伤害程度和特性、冷冻贮存时间的长短，以及其它诸如冷冻温度等因素。−20℃左右的冷冻温度对菌的伤害程度要比在例如−10℃这样的中间低温区域的低。例如：在−4℃下微生物的致死量要比在 −15℃或更低温度下的多。温度低于−24℃几乎没

有增加的效果。诸如蛋白、蔗糖、玉米糖浆、鱼、甘油和未变性的肉抽提物等食品成分会增加微生物，尤其是能引起食物中毒的微生物的冷冻存活性，然而酸性条件会降低细胞的存活性[21]。

表 15.4 鸡肉炒面中肠道菌在－25.5 ℃下的存活性

菌种	贮存不同天数（d）后的细菌数（10^5·g）								
	0	2	5	9	14	28	50	92	270
纽因香沙门氏菌	7.5	56.0	27.0	21.7	11.1	11.1	3.2	5.0	2.2
鼠伤寒沙门氏菌	167.0	245.0	134.0	118.0	11.0	95.5	31.0	90.0	34.0
伤寒沙门氏菌	128.5	45.5	21.8	17.3	10.6	4.5	2.6	2.3	0.86
鸡伤寒沙门氏菌	68.5	87.0	45.0	36.5	29.0	17.9	14.9	8.3	4.8
鸭沙门氏菌	100.0	79.0	55.0	52.5	33.5	29.4	22.6	16.2	4.2
乙型副伤寒沙门氏菌	23.0	205.0	118.0	93.0	92.0	42.8	24.3	38.8	19.0

细胞冷冻时发生的一些情况如下：

①能冻结的水称为自由水。在冷冻过程中，自由水形成冰晶体。冰晶体的增大导致细胞中所有的自由水可被相对少量的冰晶体所替代。在缓冻过程中形成细胞间的冰晶体；在急冻过程中，形成细胞内的冰晶体。结合水不发生冻结。细胞的冻结减少了细胞可利用的液态水，并使细胞脱水。

②由于水在冻结过程中以形成冰晶体的形式从细胞物质中离析出来，冻结导致了细胞内物质黏度的增加。

③冻结导致细胞质中气体，如 O_2、CO_2 的减少。O_2 的减少会抑制好氧性细胞的呼吸作用。更多的 O_2 处于扩散状态也会使细胞中氧化作用更加强烈。

④冻结导致细胞中物质的 pH 的改变。好几个研究者报道其 pH 变化范围在 0.3～2.0 个 pH 单位。在冻结和解冻中 pH 的上升和下降的事例已有报道。

⑤冻结影响细胞电解质浓度。这种影响也是由于水形成冰晶体而发生水从细胞中离析这一现象引起的。

⑥冻结使细胞原生质的胶体状态发生改变。许多细胞原生质中的成分如蛋白质在活细胞中是以动力胶体（dgnamic）态存在。适量的水对这种状态的稳定存在是必需的。

⑦冷冻导致细胞蛋白质的某些变性。这种作用的明确机理还不清楚，但已知在冻结过程中，一些—SH 基团消失，而这些基团是脂蛋白与其它成分分离后产生的。水含量的降低以及随之而来的电解质的浓缩，毫无疑问会影响细胞蛋白质状态的改变。

⑧冷冻引起一些微生物温度休克现象。这种作用对嗜热菌和嗜中温菌的影响比对嗜冷菌要大。温度在冰点以上时，温度的迅速下降比缓慢下降可造成更多细胞的死亡。

⑨冷冻可以导致诸如假单胞菌等一些微生物细胞代谢的损伤，一些微生物从冻结状态解冻后，对生长的营养要求提高。高达 40%的微生物有这种现象。

很清楚，冷冻过程对诸如细菌和其它微生物活细胞以及食品的影响是复杂的。根据

Mazur[49]的结论：微生物在零下温度的反应主要取决于溶质浓度和细胞内的冰冻情况，尽管只有很少的事实能证实这个结论。

为什么冷冻中是一些细菌而不是所有微生物均被杀死？一些小的菌体在冷冻中不能像大多数细菌那样存活下来，这包括引起人体疾病的病毒及毛线虫病的病原菌。在没有保护物存在的情况下，当冻结温度低于－5℃或－10℃时，原生动物通常可被杀死[39]。

解冻过程对微生物冻结后的存活有十分重要的意义。重复的冷冻与解冻会因细胞膜的破坏而使菌体死亡。同样，解冻越迅速，细菌存活量也越多，其机理还不甚清楚。从所列举的冷冻过程中的变化中可以发现，如果要使解冻后的菌体恢复活性，解冻过程就会变得复杂。有人指出，解冻本身比冻结要慢，而其采用的方式更具潜在的损害性。对于热交换足以传导为主的样品和产品，在解冻过程中伴随的问题有：

①在可比的温差下进行以传导为主的解冻和冻结时，解冻过程比冻结过程缓慢；

②实际上，解冻中存在的最大温差远比冻结中存在的温差小；

③解冻的时间-温度模式比冷冻更具潜在的损害性。解冻时，温度快速上升至融点附近，并且在整个解冻过程中都保持在这一温度，这样在解冻非常缓慢的情况下会给化学反应、重结晶作用，甚至微生物的生长带来机会。

有人认为，微生物的死亡不是在冻结过程中，而恰恰是在解冻过程中。究竟事实是否如此，还有待于证实。至于为什么有些微生物能在冷冻过程中存活下来，而其它的则不能，Luyet[31]认为，这与某种微生物在介质冻结时所能承受和抵抗脱水的能力有关。关于冷冻干燥后微生物的存活的原因，Luyet 解释说这可能是因为冷冻干燥时细菌仅仅只是被干燥而没有完全冻结（参见第五部分 17 中冷冻干燥对微生物影响的进一步讨论）。

大多数冷冻食品生产者反对食品解冻后的重复冻结，其原因固然是考虑冷冻食品的质构、风味和其它营养质量等问题，但这更多地与解冻的冷冻食品的微生物学特性有关。一些研究者指出：解冻食品比相似的新鲜食品更易腐败。这是因为：冻结过程中，食品的组织结构发生了相应的变化，这些变化促进了表面微生物向食品深层的入侵，因而促进了腐败。解冻时，食品表面水分挥发，由此造成食品表面微生物可利用的水溶性营养物质总浓度增大，有利于微生物的生长，这些物质包括氨基酸、矿物质、B 族维生素及其它可能存在的营养素。冷冻具有杀死某些嗜热菌和嗜中温菌的作用，由此降低了解冻后残留下来的微生物间的生存竞争性。可以想象，在解冻食品中存在的相对数量较多的适冷菌，可能加速食品的腐败。据报道，某些适冷菌在冷藏温度下的温度系数 Q_{10} 大于 4.0。例如，毒实假单胞菌在 0℃时其温度系数为 4.3。这类微生物能在温度仅上升 4～5℃的情况下，繁殖速度提高近一倍。事实上，解冻的冷冻食品是否比新鲜食品更易腐败，将取决于诸如冷冻的形式、食品冻结前所含微生物的数量和种类，以及产品解冻时的温度等大量因素。虽然对有关冷冻和解冻食品重新冻结的毒性作用还不清楚，但为了产品的全面营养质量，重新冻结应尽量减少。冻结和解冻对动物组织的影响之一是溶解酶的释放，这些酶包括组织蛋白酶、核酸酶、磷酸酶、糖酶等。这些酶一旦释放，可以使大分子降解为更易被腐败菌群利用的简单化合物。

15.7 一些嗜冷菌和适冷菌（Psychrotrophs）的特性

15.7.1 不饱和脂肪酸残基的增加

通常大多数细菌的脂含量为2%～5%，并且其中大多数或全部存在于细胞膜中。细菌脂肪由两类甘油酯构成：一类是中性脂肪，其中甘油的3个或1个或2个羟基与长链脂肪酸发生酯化；另一类是磷脂，其中1个羟基通过磷脂键与胆碱、乙醇胺、肌醇或丝氨酸连接，另外两个羟基与长链脂肪酸酯化[34]。

许多适冷菌在低温下生长时，其合成的中性脂肪和磷脂中不饱和脂肪酸的比例，要比在相对较高温度下生长时的高。嗜中温和适冷的假丝酵母菌在10℃生长时，不饱和脂肪酸的含量比在25℃生长时的要高近50%[30]。而这些酵母的磷脂成分并没有改变。产蛋白假丝酵母在其生长温度从30℃降至5℃时，不饱和脂肪酸的增加情况见表15.5。亚麻酸由于低温下油酸的消耗而增加。

表15.5 培养温度对产蛋白假丝酵母脂肪酸构成的影响

培养温度/℃	细胞浓度/(mg/mL)	脂肪酸构成[a]				
		16∶0	16∶1	18∶1	18∶2	18∶3
30	2.0	18.9	4.6	39.1	34.3	3.1
20	2.0	20.3	11.4	31.6	27.7	6.1
10	2.0	27.4	20.6	20.7	17.6	10.7
5	1.7	19.2	15.9	18.2	16.3	27.3

注：脂肪酸以X∶Y表示。X指碳数，Y是指每一分子中双键数。

[a] 数值以占总脂肪酸的百分数表示。

对4种生长在-5～15℃的弧菌和4种生长在0～25℃或27℃的假单胞菌的比较研究中发现：当生长温度从15℃降至-5℃时，各种弧菌的磷脂量发生明显的变化，但在假单胞菌的生长温度范围内未发现有此现象[5,6,26]。当生长温度降低时，假单胞菌饱和脂肪向不饱和脂肪的变化并未发生，这是因为适冷菌株中含59%至72%的不饱和脂肪，使它们比其它许多菌体更具多变性。与其它大多数适冷菌相反，嗜冷小球菌在低温下脂肪链变短，这显然降低了膜中脂质的融点[55]。

低温诱导下引起的细胞脂肪酸成分的变化现象的普遍产生，表明它们与细胞的生理机能有关。现已证明，脂质中不饱和脂肪酸比例的提高可导致脂质融点的下降。有人认为在低温下不饱和脂肪酸合成的增加有使脂质保持液态和流动态的作用，从而使膜的功能得以继续发挥。这个概念，被称为脂质固化理论（lipid solidification theory），它最初是由Gaughran[20]和Allen[3]提出的。Byrne和Chapman[8]通过实验表明，在微生物对低温的适应性方面，脂质中脂肪酸的融点比整个脂质的结构更重要。

虽然对脂质固化概念还需进一步确证，但已有详尽的事实可证实此观点，例如冷休

克现象。冷休克是指生长在适宜温度下的嗜温菌活菌体在温度骤然下降时发生的大量菌体细胞死亡的现象。大量的包括大肠杆菌在内的革兰氏阴性菌显示有此现象。一般来说，这是革兰氏阴性菌的一种特性，而革兰氏阳性菌无此特性。冷休克已被证实伴有某些低分子质量细胞组分的释放，这可能是原生质膜受破坏的结果。根据 Rose[14]的解释，发生冷休克现象的原因是：突然的冷却使膜脂质“冻结”，细胞成分从细菌体中突然放出，其结果是在细胞膜上形成致命的“小孔”。为支持这一假设，Farrell 和 Rose[15]在 30 C下对一种铜绿假单胞菌的嗜温菌株进行培养，并证明该菌细胞对冷休克敏感，然而同样菌株在 10 C下培养的菌体对冷休克却不敏感。有人认为，一种微生物的生长温度范围，取决于该菌体在设定的范围内调节其自身脂质流动性的能力[16]。

15.7.2 适冷菌合成高水平的多糖

适冷菌合成高水平的多糖这种效应的典型例子包括黏乳及黏丝面包面团的产生，低温下更易发生这两种情况。在培养温度低于明串珠菌和片球菌的最适生长温度下，更有利于这两种菌产生细胞外葡聚糖。在低温下产生更多的葡聚糖，其机理很明显是由于葡聚糖蔗糖酶在温度超出 30 C时很快就会失活[50]。已证实乳酸杆菌菌种也同样存在对温度敏感的葡聚糖蔗糖酶合成体系[10]。

从实用的观点看，低温下多糖合成的增加，是低温下肉腐败所表现出来的外观特征的原因。表现发黏是法兰克福香肠、新鲜家禽及牛肉糜细菌性腐败的特征。表面菌落的蔓延，导致了这类肉制品的发黏，毫无疑问促进了与低温肉腐败相伴的水合作用能力的提高。

15.7.3 有助于色素的形成

这种作用似乎只限于那些合成夹二氮蒽（phenazine）类色素和胡萝卜色素的微生物。这种现象的最具说服力的例子是黏质赛氏杆菌（*Senatia marcescens*）的色素形成作用。这种菌体产生一种非同寻常的热敏性酶，该酶催化一对单吡咯和双吡咯前体产生灵菌红素（红色素）[56]。其它研究者也有类似有关“在低于菌的最适生长温度下时菌能形成更多色素”这一结论的报道[40,64]。有趣的是，大量的海洋适冷菌（也许是嗜冷菌）是分泌色素的，在这一点上，细菌与酵母是一致的。另一方面，没有一株通常被研究的嗜热菌是分泌色素的。

15.7.4 一些菌株表现出不同的底物利用能力

据报道，糖在温度低于 30 C下发酵时产酸、产气，而在温度高于 30 C时只产酸[28]。类似地，一些研究者发现适冷菌在 20 C或低于 20 C时发酵葡萄糖及其它糖时产酸、产气，但在更高的温度下只产酸[62]。后一现象的原因是甲酸氢化酶体系的温度敏感性。在对相似的结果进行研究后，这些研究者将这种代谢的差异性归因于细胞氢化酶合成体系的温度敏感性。5 C时，牛肉腐败菌水解明胶和利用水溶性牛肉蛋白质的能力比 30 C时更强[32]。但这种现象是否可归因于酶的温度敏感性，就不得而知了。

15.8 低温对微生物生理机能的影响

低温培养对食品污染微生物生长和活力的影响方面，有五点已引起高度重视并概括如下。

15.8.1 适冷菌具有低的代谢速率

目前还未完全弄清低温下适冷菌代谢速率低的确切原因。随着温度的下降，适冷菌生长速度的降低要比嗜温菌更慢。一些研究发现：适冷菌的诸如乙酸盐和葡萄糖等底物的温度系数（Q_{10}）比嗜温菌的要低。当细胞破裂时，这种差异性基本消失，嗜温菌和适冷菌其葡萄糖代谢的终产物是相同的，也就是说当使用胞外抽提物(cell-free extracts)进行试验时，对适冷菌和嗜温菌而言，其温度系数基本是相同的。

温度降低时，蛋白质的合成速率会下降，而这种现象发生时，细胞 DNA 的数量并未发生改变。其原因一方面可能是低温下分子间氢键的增加导致酶蛋白折叠作用的加强，从而使酶失去催化活力[36]。另一方面，蛋白质合成速率的下降似乎与低温下各个酶合成速率下降有关。尽管对蛋白质合成速率下降的确切机理还不清楚，但有人认为其机理是低温影响阻遏蛋白（repressor protein）的合成[38]，而阻遏蛋白本身是不耐热的[39]。研究表明：低温在蛋白质合成时对 mRNA 的转录作用有影响。例如，对大肠杆菌的研究表明：这种嗜温菌的亮氨酸营养缺陷型菌株在 0℃时其合成的蛋白质中有放射性标记的亮氨酸[27]，这说明在这个温度下，所有蛋白质合成的基本步骤显然在进行并涉及多种蛋白质。据估计，这种菌在 37℃时的合成速率大约是 0℃时的 350 倍。有人认为，RNA 合成的终止与否，通常可被认定为决定低温下微生物是否生长的控制因素[25]，在对大肠杆菌研究中，已证实在低于其最低生长温度时，多核蛋白体的形成作用已不存在。多核糖体的形成作用对低温是敏感的（至少在某些菌中），蛋白质的合成作用也受到不利的影响。

不管生长温度降低时微生物代谢活性降低的机理是什么，在低温下生长的适冷菌已被证实具有较高的酶活力，因为在 0℃时适冷菌同样存在运动性，形成内生孢子及孢子萌发等功能[58]。其中霉实假单胞菌在 -7℃下经历 2～4d，在 -18℃下经历 7d，-29℃下 3 个星期后还能分泌脂酶[2]。最低生长温度除了取决于酶和细胞膜的结构外，还取决于酶合成作用[58]。另一方面，在高温下适冷菌酶分泌作用丧失的机理显然是酶合成反应的不活跃性而不是酶的失活[58]，尽管酶的失活现象也有发生（见下述）。对于单种酶而言，荧光假单胞菌在 10℃生长时分泌胞内蛋白水解酶的作用比在 20℃或 35℃时的强烈[52]。其它实验证实，霉实假单胞菌在低温下更易分泌脂酶，而在 30℃或更高温度下不分泌该酶；荧光假单胞菌在 5℃和 20℃下具有相当的脂酶分泌能力，但在 30℃下只产生微量的该酶[7]。另一方面，荧光假单胞菌蛋白质水解酶体系在 25℃下对蛋白质和血红蛋白的水解作用要比在 15℃和 5℃时的强[27]。

有人认为，生长在任何温度下的微生物细胞都存在一些运行要素，而这些要素有不同的温度敏感性[34]。因为一个或几个控制过程的过度敏感性将使微生物在某一特定的低温下停止生长，这种效应物不能通过生长介质来提供[29]。根据后一作者的观点，效应分

子和相应的变构蛋白质之间的相互作用可以认为是与温度密切相关的。

15.8.2 适冷菌细胞膜输送溶质更为有效

几项研究表明：将嗜温菌的生长温度降低至适冷菌的生长温度范围内时，嗜温菌细胞对溶质的摄入量下降。Baxter 和 Gibbons[4]的研究表明，细胞输送渗透膜失活的温度即为嗜温菌的最低生长温度。Farrell 和 Rose[14]提出了低温影响溶质摄入的三个基本机理：①低温下，某些蛋白质由于低温诱导的结果使其构象发生变化，从而导致低温下各透膜酶蛋白的失活；②低温下细胞质膜分子结构发生了变化，抑制了透膜酶的活力；③低温下细胞缺少溶质主动输送所需的能量。虽然，到目前为止对低温下细胞的溶质摄入量减少的确切机理还不清楚，但第二条机理的可能性最大[14]。

通过对 4 株嗜冷性弧菌的研究发现：在 0℃时葡萄糖和乳糖的摄入量最大，而当温度升至 15℃时摄入量反而下降。而对 4 种适冷性假单胞菌而言，15～20℃范围内对这些底物有最大的摄入量，温度降至 0℃时摄入量反而下降[26]。在 0℃时弧菌的总磷脂量有明显的变化，然而，随着生长温度的降低，假单胞菌中磷脂的量并没有明显改变。有人对生长在 10℃的单核细胞增生李斯特菌进行研究后认为：抗冷性的糖运输体系的存在，是该菌在低温下能进行正常代谢的必备条件，该系统使胞内底物的浓度处于高水平[65]。该文作者指出，抗冷性糖输送体系的存在是确认适冷菌的一项特性指标。上述结论不但适用于单核细胞增生假单胞菌，而且也适用于猪丹毒杆菌（*Erysipelothrix rhusiopathiae*）和热死环丝菌[64]。因此有人认为菌的最低生长温度取决于低温对底物摄入（吸入）的抑制作用的大小。

适冷菌在它们的细胞膜中趋于拥有能使膜具有更高流动性的脂类。适冷菌膜较高的流动性或许有利于低温下膜上物质的输送。另外，在这些条件下适冷菌的输送透膜酶的活力明显地比其它嗜温菌有效。不管输送性能增强的机理是什么，事实已经证明：低温下适冷菌在摄入溶质方面比其它嗜温菌更为有效。Baxter 和 Gibbons[4]的实验结果表明，适冷型假丝酵母结合氨基葡萄糖的速率要比嗜温型假丝酵母快得多。适冷菌在 0℃时可以输送氨基葡萄糖，但在该温度下，甚至在 0℃时嗜中温菌基本无此功能。

15.8.3 一些适冷菌产生较大的细胞

现已证实：生长在适冷条件下的酵母、霉菌和细菌其细胞体积要比生长在中温条件时的大。对产蛋白假丝酵母而言，RNA 及细胞蛋白质含量的增加被认为是使其细胞体积增大的原因[64]。其它研究者也有过有关低温下合成额外 RNA 的报道。但一个研究小组在对假单胞菌株 92 分别在 2℃和 30℃下培养试验时发现：在同样条件下，于 2℃培养时其 RNA 的数量并未增加[19]。同时该研究小组认为：微生物在低温下不存在细胞体积、蛋白质含量及过氧化氢酶活力增加的现象。但另一方面，通常认为适冷菌含有较高水平的 RNA 及蛋白质[26]。

15.8.4 鞭毛合成更为有效

低温下鞭毛生长更为有效的例子有大肠杆菌、*Bacillus inconstans*，乙型副伤寒沙门氏

菌及包括一些嗜冷菌在内的其它菌。

15.8.5 增氧作用有利于适冷菌生长

表 15.6 列出的是在三种不同的培养基下，培养温度为 4～32 C时增氧作用对荧光假单胞菌生长代时的影响效果。从表中可知，在 4 C和 10 C下增氧（摇瓶）对适冷菌的影响更为强烈，而在 32 C时增氧培养反而使代时延长[41]。对这种作用的意义还不清楚。在厌氧条件下对兼性厌氧适冷菌进行研究后可以得出如下结论：在较高温度下，菌体生长非常缓慢，残存时间长，死亡速率快，而且在厌氧培养条件下的最终细胞生成量要比在有氧培养条件时的低[56]。实验中经常发现，许多食品在低温培养条件下测得的平板菌落数要比温度在 30 C或更高情况下测得的数值高。低温下计数结果较高，其部分原因是因为低温使氧的溶解性增加，从而使氧的可利用性提高[57]。同时该研究人员发现，在 O_2 无限制的情况下，在高和低的培养温度下，均可得到较高的细胞生成量。在冷藏食品中，这种相对高的氧气的可利用性无疑会影响这类食品腐败菌群的构成。大量被研究的适冷菌是需氧或兼性厌氧的，由此也决定了在冷藏温度下食品腐败的类型。冷藏食品中只有相对较少的厌氧适冷菌被分离和研究。它们中的第一个菌是腐化梭状芽孢杆菌[10]。

表 15.6　生长温度、碳源及增氧作用对荧光假单胞菌生长代时的影响　　单位：h

生长介质[a]	培养方式	生长温度					
		4 C	10 C	15 C	20 C	25 C	32 C
葡萄糖	固定	8.20	3.52	2.02	1.47	0.97	1.19
	增氧（摇瓶）	5.54	2.61	2.00	1.46	0.93	1.51
柠檬酸盐	固定	8.20	3.46	2.00	1.43	1.01	1.24
	增氧（摇瓶）	6.68	2.95	2.02	1.26	0.98	1.45
酪蛋白水解物	固定	7.53	3.06	1.78	1.36	1.12	0.95
	增氧（摇瓶）	4.17	2.57	1.56	1.12	0.87	1.10

[a] 基本盐类＋0.02%酵母提取液＋指定的碳源。

15.8.6 一些适冷菌对有机营养物的需求增加

在一项研究中，未鉴定的水生细菌在低营养介质中的代时为在高营养介质中的 2～3 倍。

15.9 低耐热性适冷菌的性质

人们早已认识到适冷菌一般不能在温度高于 30～35 C下生长。Edwards 和 Rettger[12]首先对这种生长限制的机理进行了解释，他们认为细菌的最高生长温度无疑与细菌呼吸酶系的最低破坏温度有关。许多研究者的实验结果也证实了这一结论。已经证实，在各种适冷菌的最高生长温度下，大量的呼吸酶已经失活（表 15.7）。这样，适冷菌中存在的某些对热敏感的酶至少是限制这些菌在高温下生长的因素之一。

表 15.7 适冷微生物中的一些热不稳定性酶

酶	微生物	最高生长温度/℃	酶失活温度/℃
胞外脂酶[a]	霉实假单胞菌		30
α-酮戊二酸合成酶	隐球酵母	<28	30
乙醇脱氢酶	假丝酵母	<30	
甲酸脱氢酶	适冷菌 82	35	45
氢化酶	适冷菌 82	35	>20
苹果酸脱氢酶	海洋弧菌	30	30
丙酮酸脱氢酶	假丝酵母亚种	<20	25
异柠檬酸脱氢酶	节细菌亚种	<35	37
发酵酶	假丝酵母 P16	<25	35
NADH 氧化酶	适冷菌 82	35	46
细胞色素 C 还原酶	适冷菌 82	35	46
乳酸和甘油脱氢酶	适冷菌 82	35	46
丙酮酸分解酶	适冷菌 82	35	46
蛋白质和 RNA 合成酶	适冷微球菌	25	30

[a] 有酶失活系统。

一些适冷菌处于它们的最高生长温度以上时，由于各种胞内成分的流出而死亡。这些流出的成分包括蛋白质、DNA、RNA、游离氨基酸及磷脂。磷脂被认为来自于细胞质膜。虽然对有关细胞成分流出的机理还不是完全明了，但它似乎与细胞膜的破裂有关，并且这些现象似乎发生于酶失活之后。

不管适冷菌在比其最高生长温度略高几度的温度下立即死亡的确切机理是什么，在相对较低的温度下即发生死亡是这些菌的特征。对于那些最适生长温度在 20℃的菌，该特征尤为突出。在过去的 30 年中，对适冷菌分离和研究的结果表明：适冷菌都能在 0℃下生长，最适生长温度在 15℃或 20～25℃之间，最高生长温度在 20～35℃之间。这些菌包括革兰氏阴性杆菌、革兰氏阳性需氧或厌氧杆菌、形成芽孢和不形成芽孢菌、革兰氏阳性球菌、弧菌和酵母。Morita 和 Albright[45]对海产弧菌（*Vibrio fisheri*）进行试验后发现，其最适生长温度为 15℃，在这温度下其生长代时为 80.7min。在所有情况下，这些菌的最高生长温度仅比最适生长温度高 5～10℃。

使人感到惊奇的是，许多原料乳中的适冷菌其蛋白酶是耐热性的。这对形成孢子的微生物及假单胞菌而言也是如此。原料乳中典型的嗜冷假单胞菌能产生分子质量在（4～5）×10⁴u 之间的热稳定性金属蛋白酶，在 70℃时此酶的 D 值等于或大于 118min，一些嗜冷杆菌中此酶在 90℃时的 D 值为 5～6min。

参 考 文 献

[1] Alford, J. A., and L. E. Elliott. 1960. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate

temperatures. I. Action of *Pseudomonas fluorescens* on lard. *Food Res.* 25: 296～303.

[2] Alford, J. A., and D. A. Pierce. 1961. Lipolytic activity of microorganisms at low and intermediate temperatures. III. Activity of microbial lipases at temperatures below 0℃. *J. Food Sci.* 26: 518～524.

[3] Allen, M. B. 1953. The thermophilic aerobic sporeforming bacteria. *Bacteriol. Rev.* 17: 125～173.

[4] Baxter, R. M., and N. E. Gibbons. 1962. Observations on the physiology of psychrophilism in a yeast. *Can. J. Microbiol.* 8: 511～517.

[5] Bhakoo, M., and R. A. Herbert. 1979. The effect of temperature on psychrophilic *Vibrio* spp. *Arch. Microbiol.* 121: 121～127.

[6] Bhakoo, M., and R. A. Herbert. 1980. Fatty acid and phospholipid composition of five psychrotrophic *Pseudomonas* spp. grown at different temperatures. *Arch. Microbiol.* 126: 51～55.

[7] Bonde, G. J. 1981. Phenetic affiliation of psychrotrophic *Bacillus*. In *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*, ed. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian, and N. Skovgaard, 39～54. New York: Academic Press.

[8] Byrne, P., and D. Chapman. 1964. Liquid crystalline nature of phospholipids. *Nature* 202: 987～988.

[9] Desrosier, N. W. 1963. *The Technology of Food Preservation*. Westport, CT: AVI.

[10] Dunican, L. K., and H. W. Seeley. 1963. Temperature-sensitive dextransucrase synthesis by a lactobacillus. *J. Bacteriol.* 86: 1079～1083.

[11] Eddy, B. P. 1960. The use and meaning of the term "psychrophilic." *J. Appl. Bacteriol.* 23: 189～190.

[12] Edwards, O. F., and L. F. Rettger. 1937. The relation of certain respiratory enzymes to the maximum growth temperatures of bacteria. *J. Bacteriol.* 34: 489～515.

[13] Fairbairn, D. J., and B. A. Law. 1986. Proteinases of psychrotrophic bacteria: Their production, properties, effects and control. *J. Dairy Res.* 53: 139～177.

[14] Farrell, J., and A. Rose. 1967. Temperature effects on micro-organisms. *Ann. Rev. Microbiol.* 21: 101～120.

[15] Farrell, J., and A. Rose. 1968. Cold shock in mesophilic and psychrotrophic pseudomonads. *J. Gen. Microbiol.* 50: 429～439.

[16] Fennema, O., and W. Powrie. 1964. Fundamentals of low-temperature food preservation. *Adv. Food Res.* 13: 219～347.

[17] Fennema, O. R., W. D. Powrie, and E. H. Marth. 1973. *Low-Temperature Preservation of Foods and Living Matter*. New York: Marcel Dekker.

[18] Finne, G., and J. R. Matches. 1976. Spin-labeling studies on the lipids of psychrophilic, psychrotrophic, and mesophilic clostridia. *J. Bacteriol.* 125: 211～219.

[19] Frank, H. A., A. Reid, L. M. Santo, N. A. Lum, and S. T. Sandler. 1972. Similarity in several properties of psychrophilic bacteria grown at low and moderate temperatures. *Appl. Microbiol.* 24: 571～574.

[20] Gaughran, E. R. L., 1947. The thermophilic micro-organisms. *Bacteriol. Rev.* 11: 189～225.

[21] Georgala, D. L., and A. Hurst. 1963. The survival of food poisoning bacteria in frozen foods. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 346～358.

[22] Goldstein, A., D. B. Goldstein, and L. I. Lowney. 1964. Protein synthesis at 0℃ in *Escherichia coli*. *J. Molec. Biol.* 9: 213~235.

[23] Greene, V. W., and J. J. Jezeski. 1954. The influence of temperature on the development of several psychrophilic bacteria of dairy origin. *Appl. Microbiol.* 2: 110~117.

[24] Gunderson, M. F., and K. D. Rose. 1948. Survival of bacteria in a precooked fresh-frozen food. *Food Res.* 13: 254~263.

[25] Harder, W., and H. Veldkamp. 1968. Physiology of an obligately psychrophilic marine *Pseudomonas* species. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 12~23.

[26] Herbert, R. A. 1981. A comparative study of the physiology of psychrotrophic and psychrophilic bacteria. In *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*, ed. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian, and N. Skovgaard, 3~16. New York: Academic Press.

[27] Hurley, W. C., F. A. Gardner, and C. Vanderzant. 1963. Some characteristics of a proteolytic enzyme system of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Food Sci.* 28: 47~54.

[28] Ingraham, J. L., and G. F. Bailey. 1959. Comparative study of effect of temperature on metabolism of psychrophilic and mesophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 77: 609~613.

[29] Ingraham, J. L., and O. Maaløe. 1967. Cold-sensitive mutants and the minimum temperature of growth of bacteria. In *Molecular Mechanisms of Temperature Adaptation*, ed. C. L. Prosser, 297~309. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science.

[30] Ingraham, J. L., and J. L. Stokes. 1959. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 23: 97~108.

[31] Ingram, M. 1951. The effect of cold on microorganisms in relation to food. *Proc. Soc. Appl. Bacteriol.* 14: 243.

[32] Jay, J. M. 1967. Nature, characteristics, and proteolytic properties of beef spoilage bacteria at low and high temperatures. *Appl. Microbiol.* 15: 943~944.

[33] Jay, J. M. 1987. The tentative recognition of psychrotrophic gram-negative bacteria in 18 h by their surface growth at 10℃. *Int. J. Food Microbiol.* 4: 25~32.

[34] Jezeski, J. J. and R. H. Olsen. 1962. The activity of enzymes at low temperatures. In *Proceedings, Low Temperature Microbiology Symposium* 1961, 139~155. Camden, NJ: Campbell Soup Co.

[35] Kates, M., and R. M. Baxter. 1962. Lipid comparison of mesophilic and psychrotrophic yeasts (*Candida* species) as influenced by environmental temperature. *Can. J. Biochem. Physiol.* 40: 1213~1227.

[36] Kavanau, J. L. 1950. Enzyme kinetics and the rate of biological processes. *J. Gen Physiol.* 34: 193~209.

[37] Luyet, B. 1962. Recent developments in cryobiology and their significance in the study of freezing and freeze-drying of bacteria. In *Proceedings, Low Temperature Microbiology Symposium*, 63~87. Camden, NJ: Campbell Soup Co.

[38] Marr, A. G., J. L. Ingraham, and C. L. Squires. 1964. Effect of the temperature of growth of *Escherichia coli* on the formation of β-galactosidase. *J. Bacteriol.* 87: 356~362.

[39] Mazur, P. 1966. Physical and chemical basis of injury in single-celled microorganisms subjected to freezing and thawing. In *Cryobiology*, ed. H. T. Meryman, ch. 6. New York: Academic Press.

[40] McBryde, C. N. 1911. *A Bacteriological Study of Ham Souring*. Bulletin No. 132. Beltsville, MD: U. S. Bureau of Animal Industry.

[41] McMurrough, I., and A. H. Rose. 1973. Effects of temperature variation on the fatty acid composition of a psychrophilic *Candida* species. J. Bacteriol. 114: 451～452.

[42] Meer, R. R., J. Baker, F. W. Bodyfelt, and M. W. Griffiths. 1991. Psychrotrophic *Bacillus* spp. in fluid milk products: A review. *J. Food Protect.* 54: 969～979.

[43] Michener, H., and R. Elliott. 1964. Minimum growth temperatures for food-poisoning, fecalindicator, and psychrophilic microorganisms. *Adv. Food Res.* 13: 349～396.

[44] Morita, R. Y. 1975. Psychrophilic bacteria. *Bacteriol. Rev.* 39: 144～167.

[45] Morita, R. Y., and L. J. Albright. 1965. Cellyields of *Vibrio marinus*, an obligate psychrophile, at low temperatures. *Can. J. Microbiol.* 11: 221～227.

[46] Mossel, D. A. A., M. Jansma, and J. De Waart. 1981. Growth potential of 114 strains of epidemiologically most common salmonellae and arizonae between 3 and 17 C. In *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*, ed. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian, and N. Skovgaard, 29～37. New York: Academic Press.

[47] Mossel, D. A. A., and H. Zwart. 1960. The rapid tentative recognition of psychrotrophic types among Enterobacteriaceae isolated from foods. *J. Appl. Bacteriol.* 23: 183～188.

[48] Nashif, S. A., and F. E. Nelson. 1953. The lipase of *Pseudomonas fragi*. I. Characterization of the enzyme. *J. Dairy Sci.* 36: 459～470.

[49] Nashif, S. A., and F. E. Nelson. 1953. The lipase of *Pseudomonas fragi*. II. Factors affecting lipase production. *J. Dairy Sci.* 36: 471～480.

[50] Neely, W. B. 1960. Dextran: Structure and synthesis. *Adv. Carbohyd. Chem.* 15: 341～369.

[51] Olsen, R. H., and J. J. Jezeski. 1963. Some effects of carbon source, aeration, and temperature on growth of a psychrophilic strain of *Pseudomonas fluorescens*. *J. Bacteriol.* 86: 429～433.

[52] Peterson, A. C., and M. F. Gunderson. 1960. Some characteristics of proteolytic enzymes from *Pseudomonas fluorescens*. *Appl. Microbiol.* 8: 98～104.

[53] Reuter, G. 1981. Psychrotrophic lactobacilli in meat products. In *Psychrotrophic Microorganisms in Spoilage and Pathogenicity*, ed. T. A. Roberts, G. Hobbs, J. H. B. Christian, and N. Skovgaard, 253～258. New York: Academic Press.

[54] Rose, A. H. 1968. Physiology of microorganisms at low temperatures. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 1～11.

[55] Russell, N. J. 1971. Alteration in fatty acid chain length in *Micrococcus cryophilus* grown at different temperatures. *Biochim. Biophys. Acta* 231: 254～256.

[56] Scott, W. J. 1962. Available water and microbial growth. In *Proceedings, Low Temperature Microbiology Symposium*, 89～105. Camden, NJ: Campbell Soup Co.

[57] Sinclair, N. A., and J. L. Stokes. 1963. Role of oxygen in the high cell yields of psychrophiles and mesophiles at low temperatures. *J. Bacteriol.* 85: 164～167.

[58] Stokes, J. L. 1967. Heat-sensitive enzymes and enzyme synthesis in psychrophilic microorganisms. In *Molecular Mechanisms of Temperature Adaptation*, ed. C. L. Prosser, 311～323. Pub. No. 84. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science.

[59] Udaka, S., and T. Horiuchi. 1965. Mutants of *Escherichia coli* having temperature sensitive regulatory mechanism in the formation of arginine biosynthetic enzymes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19: 156～160.

[60] Uffen, R. L., and E. Canale-Parola. 1966. Temperature-dependent pigment production by *Bacillus*

cereus var. *alesti*. *Can. J. Microbiol.* 12: 590～593.

[61] Upadhyay, J., and J. L. Stokes. 1962. Anaerobic growth of psychrophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 83: 270～275.

[62] Upadhyay, J., and J. L. Stokes. 1963. Temperature-sensitive formic hydrogenlyase in a psychrophilic bacterium. *J. Bacteriol.* 85: 177～185.

[63] Wiebe, W. J., W. M. Sheldon, Jr. and L. R. Pomeroy. 1992. Bacterial growth in the cold: Evidence for an enhanced substrate requirement. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 359～364.

[64] Wilkins, P. O. 1973. Psychrotrophic gram-positive bacteria: Temperature effects on growth and solute uptake. *Can. J. Microbiol.* 19: 909～915.

[65] Wilkins, P. O., R. Bourgeois, and R. G. E. Murray. 1972. Psychrotrophic properties of *Listeria monocytogenes*. *Can. J. Microbiol.* 18: 543～515.

[66] Williams, R. P., M. E. Goldschmidt, and C. L. Gott. 1965. Inhibition by temperature of the terminal step in biosynthesis of prodigiosin. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 19: 177～181.

16. 食品高温保藏及嗜热微生物的特性

高温保藏食品的原理是基于高温对微生物的破坏效应基础上的。高温是指任何高于周围环境温度的温度。就食品保藏而言，通常引用的温度类别有两种：巴氏杀菌和高温杀菌。巴氏杀菌是指通过加热以达到杀灭所有致病菌（例如牛乳的巴氏杀菌）和破坏及降低一些食品中腐败微生物数量为目的的一种杀菌方式。后一目的具体例子是酷的巴氏杀菌。牛乳的巴氏杀菌作用可通过下列的加热方式获得：

63℃	30min（低温长时，LTLT）
72℃	15s（高温短时，HTST）
89℃	1.0s
90℃	0.5s
94℃	0.1s
100℃	0.01s

这些处理方式其杀菌效果是等同的，并且足以杀灭大多数耐热性的无芽孢的致病菌——肺结核杆菌和*Coxiella burnetti*。另外、牛乳的巴氏杀菌温度足以杀灭所有的酵母、霉菌、G（－）菌和许多G（＋）菌。经巴氏杀菌后残存在乳中的微生物可分为两类：耐热菌（thermodurics）和嗜热菌（thermophiles）。耐热菌是指在相对高的温度下可以残存，但不能在这些温度下正常生长的微生物。残存于巴氏杀菌乳中的非芽孢菌通常是链球菌和乳杆菌属菌，有时也有其它属的菌。嗜热菌是指那些不但可以在相对较高的温度下残存下来，而且它们的生长和代谢活性的维持需要高温的那些菌。食品加工中最重要的嗜热菌存在于芽孢杆菌和梭状芽孢杆菌属中。酿造工业中啤酒的巴氏杀菌（杀灭腐败菌群）方式通常为60℃，8～15min。

高温灭菌是指以杀灭所有通过平板或其它计数方法可以测出的活菌为目的的一种杀菌方式。罐头食品的杀菌有时称为“商业无菌”，它表明在杀过菌的罐头中，采用常规的培养方法无活菌检出或残存的菌数非常低，以至于在罐头生产和贮存条件下菌数不会有明显的变化。也就是说在罐头食品中可能残存有微生物，只不过在贮存过程中由于不适宜的pH、Eh或温度使其不能在产品中生长。

乳和乳制品加工的最新进展是超高温技术（UHT）的应用。用这种技术生产的产品以其自身的特点有别于巴氏杀菌乳。UHT处理的主要特点有：它保留了牛乳原有的自然特性，适合无菌贮存和保证从杀菌器出来的乳无菌，高温（140～150℃）及相应所需的短时（几秒）即可使产品达到商业无菌要求[22]。UHT加工乳比用常规巴氏杀菌工艺生产的乳更受消费者的欢迎，这是因为它们是商业无菌的，在室温下贮存时间可长达8周，在此期间也不会发生风味上的改变。

16.1　影响微生物耐热性的因素

相同数量的菌将其分别置于相同 pH 的生理盐水和营养培养液中，以相同的热力杀菌方式进行杀菌，其杀菌结果是不同的。对 11 种有关微生物和其生存环境因素或参数对菌热致死作用的影响已进行了研究，并归纳如下[120]。

16.1.1　水

微生物的耐热性随着其水分含量的降低而增强。即使是同一菌种的微生物，将其干燥细胞和湿细胞分别放入试管中，然后在水浴上进行加热，前者所表现出的菌的耐热性要比后者的强得多。这是因为在水中加热时，菌体蛋白质变性速率要比在空气中加热时的快。有人认为，蛋白质的变性是菌热致死的机理或者说是热致死至少与蛋白质变性密切相关（参见下述内容）。至于水分促进蛋白质变性的确切机理还不完全清晰，但有人认为，对湿蛋白加热能导致游离—SH 基的形成，从而使蛋白质的水合能力（water-binding capacity）提高。水的存在使肽键对热破坏更为敏感，在无水情况下破坏肽键需要更高的能量，肽键的破坏也使菌体对热的折射作用更为强烈。

16.1.2　脂肪

脂肪的存在使一些微生物的耐热性增强（表 16.1）。这是因为脂肪有热保护作用，并且有时人们认为它可以通过直接影响细胞的水分而使菌的热抗性提高。Sugiyama[44]证实：长链脂肪酸对肉毒梭状芽孢杆菌具有热保护作用。并且长链脂肪酸的保护作用似乎要比短链脂肪酸的更好。

表 16.1　　介质对大肠杆菌热致死点的影响

介质	热致死温度点/℃	介质	热致死温度点/℃
奶油	73	乳清	63
全脂乳	69	肉汤（broth）	61
脱脂乳	65		

注：加热时间 10min。

16.1.3　盐

盐对微生物耐热性的作用是多方面的，它取决于使用盐的种类、浓度及其它因素。有些盐对微生物有保护作用，而另一些盐则会使微生物对热更为敏感。有人提出，有些盐之所行能增加微生物的耐热性，其机理可能是它们降低了介质的水分活度的缘故，类似于干燥对耐热性的影响。然而有些盐能增加水分活度（如 Ca^{2+} 和 Mg^{2+}），由此反而使微生物的热敏性提高。现已证实：在巨大芽孢杆菌孢子的生长培养基中，加入 $CaCl_2$ 可使孢子的耐热性提高，而加入 L-半乳糖、L-脯氨酸或增加磷酸盐的含量，则会降低菌的耐

热性[27]。

16.1.4 碳水化合物

菌悬浮液中糖的存在可以提高微生物的耐热性。产生这种效果的原因至少在部分上是由于高浓度的糖使水分活度降低的缘故。然而从表 16.2 中桑夫登堡格沙门氏菌 775W 菌的 D 值可以看出糖和醇种类不同对其耐热性的影响是有很大的不同。在用甘油和蔗糖调节达到相同 A_w 的情况下，由于调节 A_w 所用的物质不一，菌的热敏性也有很大的不同[3,19]。Corry[12]发现：蔗糖比其它 4 个试验的碳水化合物更能提高桑夫登堡格沙门氏菌的耐热性。5 种试验碳水化合物的排序是：蔗糖＞葡萄糖＞山梨糖＞果糖＞甘油。

16.1.5 pH

微生物在它们最适生长的 pH 下具有最大的耐热性。而这 pH 一般在 7.0 左右。当 pH 高于或低于其最适生长 pH，会使其热敏性增加（图 16.1）。正是利用这点，高酸性食品在比中性或接近中性的食物要低的热处理强度下即可取得同样的杀菌效果。蛋白质的巴氏杀菌提供了一个碱性食品热处理前对其进行中性化的例子，而其它食品中通常不进行这种操作。蛋白质的 pH 大约为 9.0，当这种产品在 60～62℃，3.5～4min 条件下进行巴氏杀菌时，蛋白质会发生凝结，其黏度明显提高。这些变化会直接影响用这种巴氏杀菌蛋白质制成的蛋糕的体积和质构。Cunningham 和 Lineweaver[13]的研究报告提到：当鸡蛋白的 pH 降至约为 7.0 时，可以和全蛋采用一样的巴氏杀菌条件。pH 的降低可使微生物和蛋白质均具更高的热稳定性。添加的铁或铝盐可增强高热不稳定性的鸡蛋伴清蛋白（Conalbumin）的稳定性，使其经受得起 60～62℃的巴氏杀菌。与细菌在其它材料中所表现的耐热性不同，细菌在 pH 为 5.4～5.6 的液体全蛋中的耐热性远高于其在 pH8.0～8.5 下的耐热性（表 16.2）。用 HCl 等酸将 pH 调低时，情况也是如此。但当用诸如乙酸或乳酸等有机酸调低 pH 时，其耐热性会降低。

表 16.2 报道的桑夫登堡格沙门氏菌的 D 值

温度 ℃	D 值	条件
61	1.1min	液体全蛋
61	1.19min	胰蛋白胨培养液
60	9.3min[a]	液体全蛋，pH 约为 5.5
60	9.0min[a]	液体全蛋，pH 约为 6.6
60	4.6min[a]	液体全蛋，pH 约为 7.4
60	0.36min[a]	液体全蛋，pH 约为 8.5
65.6	34～35.3s	乳
71.7	1.2s	乳
70	360～480min	奶油巧克力
55	4.8min	TSB[b]，对数生长期，35℃下生长
55	12.5min	TSB[b]，对数生长期，44℃下生长

续表

温度/℃	D 值	条件
55	14.6min	TSB[b]，稳定生长期，35℃下生长
55	42.0min	TSB[b]，稳定生长期，44℃下生长
57.2	13.5min[a]	A_w0.99（4.9%甘油），pH6.9
57.2	31.5min[a]	A_w0.90（33.9%甘油），pH6.9
57.2	14.5min[a]	A_w0.99（15.4%蔗糖），pH6.9
57.2	62.0min[a]	A_w0.90（58.6%蔗糖），pH6.9
60	0.2～6.5min[c]	HIB[d]，pH7.4
60	2.5min	A_w0.90，HIB，甘油
60	75.2min	A_w0.90，HIB，蔗糖
65	0.29min	0.1mol/L 磷酸盐缓冲液，pH6.5
65	0.8min	30%蔗糖
65	43.0min	70%蔗糖
65	2.0min	30%葡萄糖
65	17.0min	70%葡萄糖
65	0.95min	30%甘油
65	0.70min	70%甘油
55	35min	A_w0.997，胰胨大豆琼脂，pH7.2

[a] 平均值；[b] 胰胨大豆培养液；[c] 总共 76 株；[d] 心浸出液培养液。

16.1.6　蛋白质和其它底物

加热物中存在蛋白质对微生物有热保护作用。因此，为了取得相同的杀菌效果，高蛋白含量的食品其加热程度必须高于低蛋白食品。在相同菌数的情况下，加热物中如存在胶粒大小的粒子对微生物也有热保护作用。例如：在相同的菌数、pH 等条件，豌豆酱的杀菌时间要比营养肉汤的长。

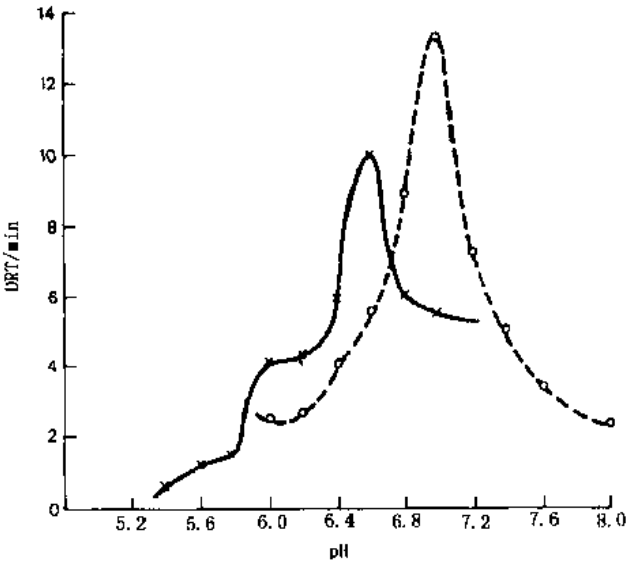


图 16.1　pH 对粪肠球菌 D 值的影响

注：60℃，不同 pH 下，在柠檬酸盐-磷酸盐缓冲液（—×—）和磷酸盐缓冲液（--○--）溶液中进行。

16.1.7　菌数

菌数越多，耐热程度越高（表 16.3）。原因是高菌浓度下细胞自己产生具有热保护作用的物质。目前已经有人发现了这种物质的存在。考虑到蛋白质具有热保护作用，而菌体许多胞外物质属于蛋白质，因此，它具有提供热保护作用的能力。高菌浓度比低菌浓度具有更高耐热性的另一

个重要原因可能是：高菌浓度下存在具不同程度的自然耐热性菌的可能性更高。

表 16.3 肉毒梭状芽孢菌芽孢数对热致死时间的影响（100 ℃）

芽孢数	热致死时间/min	芽孢数	热致死时间/min
7.2×10^{10}	240	6.5×10^{5}	85
1.64×10^{9}	125	1.64×10^{4}	50
3.2×10^{7}	110	328	40

16.1.8 菌龄

处在稳定生长期的细菌细胞耐热性最强，而处在对数生长期的菌的耐热性较弱。这结论对桑夫登堡格沙门氏菌也适用（表 16.2），处于稳定期中的桑夫登堡格沙门氏菌的耐热性要比处在对数期中的高几倍[41]。处在生长滞后期初期的菌耐热性较高，随着细胞进入生长对数期其耐热性降至最低。据报道，老龄芽孢比幼龄芽孢具有更高的耐热性。低活动性微生物细胞其耐热性增加的机理无疑是复杂的，解释之相当困难。

16.1.9 生长温度

当菌的培养温度提高时，微生物的耐热性趋于增强，形成芽孢的菌尤为如此。虽然对这种效应的确切机理还不清楚，但可以想象在高温下的基因选择作用有利于更耐热菌株的生长。生长在 44℃下的桑夫登堡格沙门氏菌其耐热性比生长在 35℃的要高 3 倍（表 16.2）。

16.1.10 抑制成分

在有耐热性抗菌素、SO_2 和其它抑菌剂存在的情况下对菌进行加热，大多数菌的耐热性会下降。在控制某些食品腐败方面，热力作用加抗菌素和热力作用加亚硝酸盐，比单独应用某一因素更为有效。食品热处理前加入抑制剂的实际意义是降低加热程度（参见第五部分 13）。

16.1.11 时间和温度

有人可能认为加热时间越长，热力杀菌的效果也越大。通常这是对的，然而，这一基本规律也有例外。更为科学的提法应该是：温度越高，热力杀菌效果越大。在表 16.4 中，以细菌芽孢为例对此作了说明。温度升高时，取得同样杀菌效果的时间就可减少。

表 16.4 温度对芽孢热致死时间的影响

温度/℃	肉毒梭状芽孢杆菌热致死时间（pH7 的缓冲液中芽孢数为 60×10^{11} 个）	嗜热菌热致死时间/min（1.5×10^{5} 个芽孢/mL 玉米汁，pH6.1）
100	260	1140
105	120	

续表

温度/℃	肉毒梭状芽孢杆菌热致死时间 (pH7 的缓冲液中芽孢数为 60×10^{1} 个)	嗜热菌热致死时间/min (1.5×10^{5} 个芽孢/mL 玉米汁，pH6.1)
110	36	180
115	12	60
120	5	17

这些规律是在假定加热作用是瞬间进行的，而无机械阻隔或干扰因素存在的前提下得出的。加热容器的大小及材料（玻璃、金属、塑料）对加热效果也有重要影响。在大容器中进行巴氏杀菌或高温灭菌显然比在小容器中需花费更长的时间。对用热传导不良壁容器包装的食品的杀菌也是如此。

16.1.12 超声波的作用

在加热前或加热过程中，将细菌孢子进行超声波处理可以使孢子的耐热性下降（参见 16.4）。

16.2 微生物的相对耐热性

一般来说，微生物的耐热性与它们的最适生长温度有关。嗜冷菌对热最敏感，其次是嗜温菌和嗜热菌。芽孢菌比非芽孢菌更具耐热性，而嗜热芽孢菌一般比嗜温芽孢菌更具耐热性。就革兰氏反应而言 G（+）菌比 G（-）菌具有更高的耐热性；球菌一般比非芽孢杆菌耐热。酵母和霉菌对热相当敏感，酵母的子囊孢子耐热性稍高于其营养酵母体。霉菌无性孢子的耐热性稍高于霉菌菌丝体。菌核（sclerotia）是所有类型中最耐热的，有时可残存于水果罐头中造成罐头的腐败。

16.2.1 芽孢的耐热性

在食品热力杀菌保藏中，细菌芽孢所具有的极高的耐热性是一个需要极为关注的问题。

一般认为，下列一个因素是芽孢具耐热性的原因：原生质体脱水作用、矿物化作用和热适应作用。原生质体脱水作用似乎是主要因素，对耐热性低的芽孢，例如巨大芽孢杆菌芽孢尤其如此。孢子原生质体是细胞除去细胞壁后剩下的那部分物质。在原生质体中富含 Ca^{2+} 和 2,6 吡啶二羧酸，它们形成具有胶体性质的钙-吡啶二羧酸复合物。一般认为原生质体的水分含量决定了芽孢的耐热性。根据生长在缺钙介质中的芽孢以及吡啶二羧酸营养缺陷型芽孢耐热性下降的事实可以认为：钙和吡啶二羧酸在原生质体含水量方面具有重要的作用。现已证实：原生质体的脱水和收缩作用是芽孢耐热性的主要因素[38]。但其它因素也有一定的追加效应[39]。

生长在最高生长温度下的某细菌的芽孢的耐热性要比生长在较低温度下的高得多[40]。原因似乎是由于热力适应作用导致原生质体的含水量降低，使芽孢具有更高的耐

热性[7]。无机盐含量的变化也会影响菌的耐热性。虽然上述三个因素对芽孢的耐热性都有影响，但脱水作用似乎是最重要的[7]。

16.3 微生物的热致死作用

为更好地了解与食品保存和罐头制作有关的微生物热致死作用，必须懂得有关该技术的一些基本概念。下面是一些相对重要的基本概念。如要对细菌热力学作进一步的研究，可参见 Stumbo[42]的有关专题论述。

16.3.1 热力致死时间（TDT）

热力致死时间是指在特定的温度下，杀死一定数量的微生物所需的时间。以这种方法，在温度保持恒定的情况下，可以确定杀死所有微生物所需的时间。热致死温度是指在固定的时间内，通常是 10min，杀死一定数量的微生物所要求的杀菌温度。确定 TDT 的方法有多种：试管法、罐头法、“罐”法、烧瓶法、耐热性测定仪法、开放型试管法和毛细管法等。用这些方法测定 TDT 的基本步骤是将已知数量的细菌或芽孢放入一系列密封容器中，以便得到为每个试验阶段所需的残存菌数。然后将菌放入油浴中，按要求的时间阶段进行加热。在每个加热阶段结束时，将容器移出并立即放于冷水中快速冷却。菌体随即放置于合适的生长介质中进行培养计数。在细菌是悬浮于生长介质中进行 TDT 试验的，可直接将盛有处理过的菌体的容器在合适温度下培养。判定致死的方法是菌体不能形成可见菌落。

16.3.2 *D* 值

D 值是指指数递减时间，或指杀灭 90%微生物所需要的时间。*D* 值在数值上等于细菌残存曲线横过一个对数周期所需的时间（min）（图 16.2），数值上等于残存曲线斜率的倒数，是表示某种微生物死亡速率的一种方法。121.1℃下的 *D* 值通常表示为 D_r。表 16.5

表 16.5 115.6℃下，pH 对生长于三种食品中肉毒梭状芽孢杆菌 *D* 值的影响

pH	意大利式面条、土豆泥及奶酪 *D* 值/min	通心粉 *D* 值/min	西班牙大米 *D* 值/min
4.0	0.128	0.127	0.117
4.2	0.143	0.148	0.124
4.4	0.163	0.170	0.149
4.6	0.223	0.223	0.210
4.8	0.226	0.261	0.256
5.0	0.260	0.306	0.266
6.0	0.491	0.535	0.469
7.0	0.515	0.568	0.550

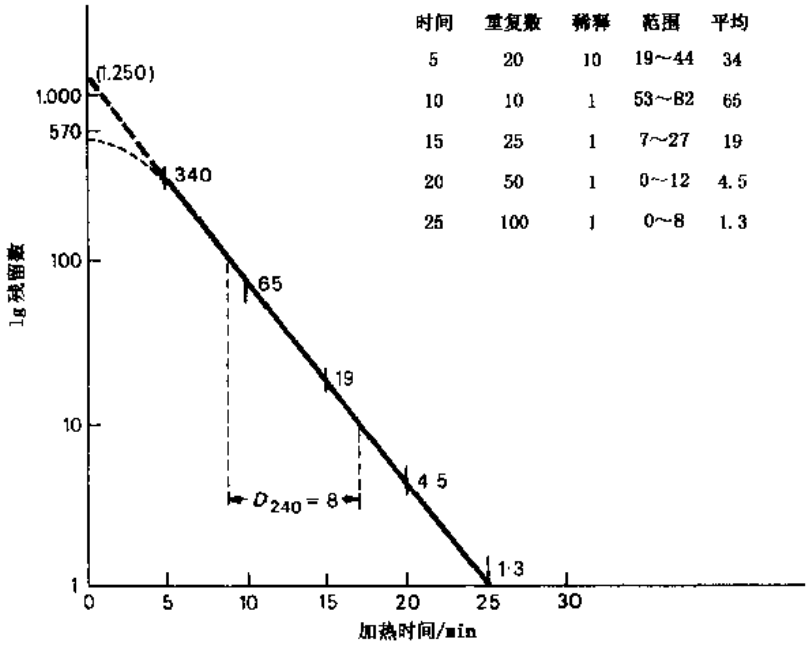


图 16.2　致死率曲线（残存曲线）

注：F.S.7 菌孢子，115.6℃，pH6.2 盐水青豆罐头。

中表示的是 pH 对不同食品中肉毒梭状芽孢杆菌 D 值的影响结果。不同条件下桑夫登堡格沙门氏菌 775W 的 D 值列于表 16.2。金黄色葡萄球菌在 47.8℃下的 D 值为 0.20～2.20min，*Coxiella burnetti* 在 47.8℃下的 D 值为 0.50～0.60min，人型分枝杆菌在 47.8℃下的 D 值为 0.2～0.3min 之间[142]。在西红柿中导致 pH 升高的菌株—地衣形芽孢杆菌的芽孢，在 95℃时的 D 值为 5.1min，而凝结芽孢杆菌在 95℃下的 D 值为 13.7min[142]。

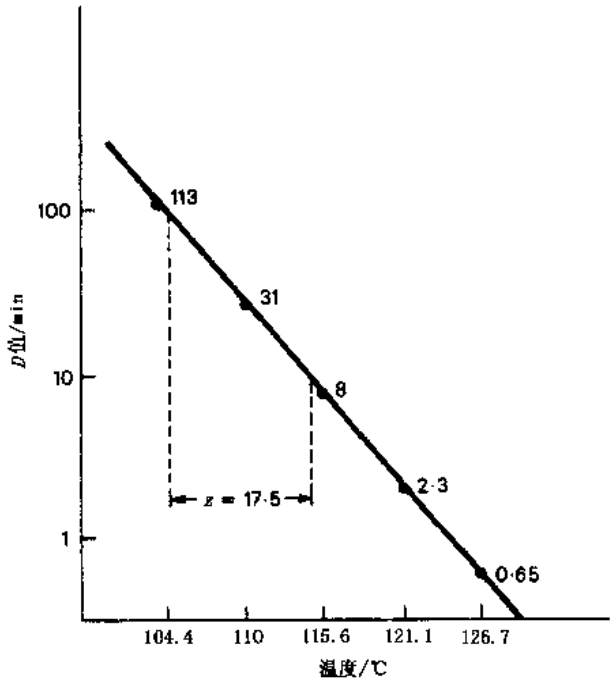


图 16.3　热力致死时间曲线

注：pH6.2，盐水青豆罐头，F.S.7 菌孢子。

16.3.3　Z 值

Z 值是指使热力致死曲线经过一个对数周期所需温度值。数值上等于 TDT 曲线斜率的倒数（图 16.3）。D 值反映的是一种微生物在特定温度下的耐热性，而 Z 值反映

的是微生物在不同致死温度下的相对耐热性。它可以用于对不同温度下的热力作用进行等值换算。例如：如 60℃、3.5min 是一个合适的加热处理过程，并且对象菌的 Z 值为 8.0。则 64.4℃下 0.35min 或 55.6℃下 35min 的热处理效果与 60℃、3.5min 的是等同的。

16.3.4 F 值

所有温度下的热力杀菌效果相当于 121.1℃下的等效杀菌时间，以 min 表示。用于表示杀灭某种微生物孢子或营养细胞的能力。加热过程中一个容器所有点的热致死值总和称为 F_s 和 F_0。它可以表示对每个容器的热处理过程能降低某种微生物的芽孢或营养细胞数量能力的大小。如假定含有芽孢、生长细胞或食品的试验容器其加热和冷却都能瞬间完成，F_0 值可按下式计算：

$$F_0 = D_r(\lg a - \lg b)$$

式中 a——微生物的初始菌量

b——杀菌后的残留量

16.3.5 热力致死时间曲线

为了说明热力致死曲线和 D 值，引用了 Gillespy[18]所做的在 115.6℃，pH 为 6.2 下对盐水豌豆罐头中的平酸菌孢子进行热杀菌的实验结果数据。计数时间间隔为 5min、以平均存活数表示：

时间/min	平均存活数
5	340.0
10	65.0
15	19.0
20	4.5
25	1.3

在半对数坐标上，加热时间（min）沿图表轴线标出，存活数沿纵轴以对数坐标标出构成 TDT 曲线，如图 16.2。在半对数坐标上，该曲线基本上是一条直线，这表明细菌的热力致死作用是呈对数变化的，并符合一级反应规律。虽然在 TDT 曲线的任一端进行计算有一定困难，但在罐头工业中的工程计算可以依据一个致死对数周期来确定。从图 16.2 的数据，计算得出的 D 值应为 8min，或 $D_{240}=8.0$。

D 值可用以反映孢子或营养细胞的相对耐热性。最耐热的肉毒梭状芽孢杆菌 A 型和 B 型芽孢的 D_r 值为 0.21，然而最耐热的嗜热菌芽孢的 D_r 值大约为 4.0～5.0，stumbo 等人[43]发现：腐败厌氧细菌（P.A）3679 在乳剂型玉米中的 D_r 值为 2.47。而在全脂乳中平酸孢子（F.S）617 的 D_r 值为 0.84。

使用 D_r 值可对嗜热和嗜温型腐败菌的耐热性作近似的比较。

嗜热脂肪芽孢杆菌：4.0～5.0

嗜热解糖梭状芽孢杆菌：3.0～4.0

致黑梭状芽孢杆菌：2.0～3.0

肉毒梭状芽孢杆菌（A 型和 B 型）：0.10～0.20

生芽孢梭状芽孢杆菌（包括 P. A3679）：0.10～1.5

凝结芽孢杆菌：0.01～0.07

pH 及悬浮介质对肉毒梭状芽孢杆菌芽孢 D 值的影响列于表 16.5。由上可知，微生物在中性或中性附近时具最大的耐热性，并且在不同的食品中有不同的耐热性。

为了计算 Z 值，将 D 值标于对数座标轴上，摄氏温度值沿水平轴线标出。从图 16.3 的数据，可以得出 Z 值为 17.5。肉毒梭状芽孢杆菌的 Z 值为 14.7～16.3，然而对 P. A3679，其范围在 16.6～20.5。据报道，一些芽孢的 Z 值可高达 22。过氧化物酶的 Z 值为 47，核黄素和硫胺素的 Z 值分别为 50 和 56。

16.3.6 12-D 概念

12-D 是罐头工业中对热力杀菌过程中菌的致死率要求，指将最耐热的肉毒梭状芽孢杆菌芽孢残存的可能性降至 10^{-12} 所需的最小热处理强度。因为肉毒梭状芽孢杆菌孢子在 pH 低于 4.6 下不发芽和产生毒素，所以这个概念只适用于 pH 高于 4.6 的食品。下面是 Stumbo[43] 从罐头制作技术方面来说明这个概念的一个例子。如果假定一个食品罐头中只有一个肉毒梭状芽孢杆菌的孢子，F_0 可以用残存曲线方程及其它上述的假设进行计算：

$$F_0 = D_r(\lg a - \lg b)$$

$$F_0 = 0.21(\lg 1 - \lg 10^{-12})$$

$$F_0 = 0.21 \times 12 = 2.52$$

因此 121.1℃下 2.52min 的杀菌过程可以将肉毒梭状芽孢杆菌孢子数降至每 10^{12} 个罐头中只有一个芽孢。如果考虑到某些平酸孢子的 D_r 值为约 4.0（有些罐头是以平酸菌孢子为杀菌对象的）及一些罐头食品实际处理的 F_0 值为 6.0～8.0，肉毒梭状芽孢杆菌芽孢可能存在的数量会更低。

16.4 热-超声波协同作用（manother mosonication，或 MTS）

当细胞芽孢同时进行超声波和热力处理时，芽孢的耐热性会下降。虽然在加热前进行超声波处理也会使菌的耐热性有所下降，但当这两种作用同时进行时，其降低效果更大。西班牙的研究人员已对此现象进行了研究，并将该现象命名为“manother-mosonication”或“热-超声波协同作用”[35]。除了芽孢，MTS 对降低过氧化物酶脂肪氧化酶、多酚氧化酶的耐热性也有作用。

早期有关 MTS 对耐热性影响的研究是使用 1/4 强度 Ringer's 溶液，110℃下蜡状芽孢杆菌的 D 值可从 11.5min 降至 1.5min，地衣形芽孢杆菌在 99℃下的 D 值从 5.5min 降至 3min[10]。在对全脂乳和两株枯草芽孢杆菌进行试验时，可比的 Z 值分别为 9.12～9.37 和 6.72～6.31。其中一株的 D 值在 100℃下由 2.59min 降至 1.60min。另一株则从 11.30min 降至 1.82min[16]。超声波的波长为 20kHz、功率为 150W 时，Z 值结果显示 MTS 对 Z 值的影响最小[36]。

至于超声波处理降低细菌孢子耐热性的可能机理，对嗜热脂肪芽孢杆菌进行研究后发现，超声波对细胞中钙、吡啶二羧酸、脂肪酸及低分子质量化合物的释放有影响[38]。对芽孢的这种影响被认为是由于超声波改变了细胞水合状态引起的，由此降低了耐热性。但这种解释无法适用于 MTS 对酶的作用。

16.5 无菌包装

传统的罐头生产工艺，未经杀菌的食品放入未经灭菌的金属或玻璃的容器中，然后进行封罐、杀菌。在无菌包装中，无菌食品在无菌条件下放入无菌容器中，包装密封也在无菌条件下进行。虽然无菌包装的一套方法在 20 世纪 60 年代早期就申请了专利，但一直很少采用，直至 1981 年美国 FDA 批准在无菌包装系统中允许使用 H_2O_2 作为多层复合包装材料的杀菌剂后，才被广泛采用。

通常来讲，任何可通过热交换器进行加热的食品都可采用无菌包装。无菌包装技术广泛使用于诸如果汁等液体食品生产中，已研制了许多这种类型的纯液体食品。但对含颗粒的食品，这种技术的推广就有很大的困难。就从食品微生物学角度考虑，在这么多问题中，只有一个问题是需要考虑的：在确定流过换热器的食品的杀菌程度时，总是以流动最快的部分（其在换热器中滞留的时间最短）为检测对象，而含颗粒食品中颗粒与液体同时存在，前者的运动速度相对较低，并且固体和液体它们的热渗透速率是不同的。这就增加了确定有效杀灭微生物和酶的最低热处理要求的困难性。

无菌包装的一些优点如下：

①使果汁这类产品的风味更佳，不会产生在金属容器中进行加工的产品有金属味；

②可以使用多层纸盒进行包装，取代原有的玻璃或金属容器；

③使用超高温杀菌技术时，可使产品在高温下的处理的时间达到最短；

④使在某些液体食品中采用膜过滤技术变得可行；

⑤可以在包装容器顶隙中充填诸如 N_2 等气体。

无菌包装的缺点是在防止 O_2 渗入方面要比玻璃或金属包装的差，产量要比采用固体容器的低。

现已采用的无菌包装技术已有多种，许多新的技术还在开发、研究之中。对包装系统进行灭菌的方法有多种，其中一种是将整卷的包装材料连续输送至一个设备内，在这里面用热的 H_2O_2 对包装材料进行杀菌，接着进行容器的成型、装填食品及进行密封。装填操作中的无菌状态可以通过使无菌空气或 N_2 等气体保持正压的方式来维持。无菌包装的果汁具有良好的货架稳定性，在室温下可保存 6～12 个月。

无菌包装食品的腐败不同于金属包装的食品。高酸性食品在金属容器中会发生“氢胀”现象，而无菌包装是非金属的，不会发生该现象。无菌包装食品中也不太可能发生包装容器接缝泄漏现象，但在低酸性食品中，在非金属和非玻璃包装容器中，由于 O_2 的渗入会造成另外一些类型的腐败。

16.6 嗜热菌的一些特性

以生长温度为依据，嗜热菌是指最低生长温度45℃左右，最适生长温度50～60℃，最高生长温度70℃或70℃以上的那些微生物。根据这个界定，嗜热菌种（株）可存在于蓝绿藻、原始细菌、放线菌[16]、厌氧光合细菌、硫细菌、海藻、真菌、芽孢菌、梭状芽孢菌、乳酸菌和其它属中。在食品中最重要的嗜热菌存在于芽孢杆菌、梭状芽孢杆菌和嗜热厌氧菌（*Thermoanaerobacterium*）属中。

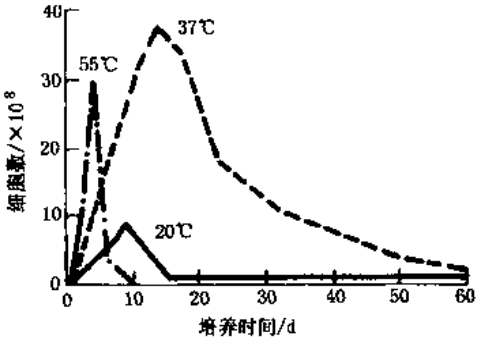


图16.4　20℃、37℃和55℃下菌的生长曲线

嗜热菌生长过程中，生长滞后期很短，有时甚至难以测出。而其孢子的萌发及生长很迅速，对数生长期持续时间很短。在高温下一些嗜热菌的生长代时有时短至10min。其死亡速率也很高。在低于嗜热菌生长温度范围内会失活或“自动杀菌”是这类菌的特点。在55℃、37℃和20℃下细菌生长曲线的比较可见图16.4。

为什么有些微生物要求的生长温度对其它菌反而有致死作用，这个问题不但要从食品保藏作用方面，而且还要从嗜热菌的生物学特性方面加以考虑。下面综述的是嗜热菌的一些特点。

16.6.1 酶

嗜热菌中的酶可分为三类：

①在作用温度下是稳定的，但在比这稍高一点的温度下会失活的酶类，如苹果酸脱氢酶、三磷酸腺苷酶、焦磷酸酶、醛缩酶和一些肽酶。

②在作用温度下如缺少某些特定的底物会失活的酶类，如天门冬酰胺脱胺酶、过氧化氢酶、丙酮酸氧化酶、异柠檬酸裂合酶和一些膜结合酶（membrane-bound enzymes）。

③高耐热性的酶和蛋白质，如α-淀粉酶、一些蛋白酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、一些氨基酸活化酶、鞭毛蛋白质、酯酶及嗜热菌蛋白酶。

一般来说，嗜热菌在嗜热生长条件下分泌产生的酶的耐热性要比嗜温菌产生的酶强得多（表16.6）。特别要提出的是：由嗜热脂肪芽孢杆菌分泌产生的α-淀粉酶，在70℃下加热24h仍具活力。在其最适pH6.9的情况下，该淀粉酶的最适作用温度为82℃[40]。这种酶的热稳定性需Ca^{2+}的参与。从4株嗜热菌分离得到的原生质体蛋白的热稳定性要比4株嗜温菌的高[24]。

至于为什么嗜热菌的酶系具耐热性，有几种可能的原因。其中一种是：在嗜热菌酶系中疏水性氨基酸的比例要高于嗜温菌相似酶系中的疏水氨基酸比例。而疏水性蛋白质越多，耐热性越高。至于氨基酸，实验证实：赖氨酸替代酶中的谷氨酸会降低酶的热稳定性，而用其它氨基酸进行替代时会提高酶的热稳定性[26]。另一因素与金属离子（例如

Mg^{2+}）的结合有关。嗜热脂肪芽孢杆菌原生质体膜结构的完整性说明它可受二价阳离子影响[50]。

表 16.6 嗜温菌和嗜热菌分泌的酶以及它们的热稳定性和其它特性的比较

菌种	酶	热稳定性/%	半胱氨酸含量/(mol/mol 蛋白质)	相对分子质量	稳定性对金属离子的要求
枯草芽孢杆菌	枯草杆菌蛋白酶 BPN′	45(50℃,30min)	0	28000	是
枯草芽孢杆菌	中性蛋白酶	50(60℃,15min)	0	44700	是
铜绿假单胞菌	碱性蛋白酶	80(60℃,10min)	0	48400	是
铜绿假单胞菌	胰肽酶	86(75℃,10min) 10(70℃,30min)	4.6	39500	是
A 链球菌群	链球菌蛋白酶	0(70℃,30min)	1	32000	
溶组织梭状芽孢杆菌	胶原酶	1.5(50℃,20min)	0	90000	
灰色链霉菌(*St. griseus*)	碳色链孢菌蛋白酶	60(60℃,10min)			是
B. themoproteodyticus	嗜热菌蛋白酶	95(60℃,120min) 50(80℃,20min)	0	42700	是
枯草芽孢杆菌	α-淀粉酶	55(65℃,20min)	0	50000	是
嗜热脂肪芽孢杆菌	α-淀粉酶	100(70℃,24h)	4	15500	

注：括号内数据表示热处理条件，热稳定性（%）表示热处理活力的保存率。

总的说来，嗜热菌的蛋白质在分子质量、氨基酸构成、变构作用物（effectors）、次级构成（subuint composition）及一级结构等与嗜温菌基本相似。极度嗜热和专性嗜热菌合成大分子，这种大分子有足够的分子内部稳定性可以抵抗热的作用[1]。

16.6.2 核糖体（Ribosomes）

一般来说，核糖体的热稳定性与微生物的最高生长温度相对应（表 16.7）。耐热的核

表 16.7 核糖体的融点和最高生长温度

菌和株数	最高生长温度/℃	核糖体融点/℃
海产弧菌（15381）	18	69
7E-3	20	69
1-1	28	74
海产弧菌（15382）	30	71
2-1	35	70
脱硫弧菌（*D. desulfuricans*）[a]	40	73

续表

菌和株数	最高生长温度/℃	核糖体融点/℃
D. vulgaris (8303)[a]	40	73
埃希氏大肠杆菌 (B)	45	72
埃希氏大肠杆菌 (Q13)	45	72
伊得氏螺菌 (*S. itersonii*) (SI-1)[b]	45	73
巨大芽孢杆菌	45	75
枯草芽孢杆菌 (SB-19)	50	74
凝结芽孢杆菌 (43P)	60	74
D. nigrificans (8351)[c]	60	75
嗜热菌 194	73	78
嗜热脂肪芽孢杆菌 (T-107)	73	78
嗜热脂肪芽孢杆菌 (1503R)	73	79
嗜热菌 (Tecce)	73	79
嗜热脂肪芽孢杆菌-16	73	79

[a] 脱硫弥菌；[b] 螺菌 (Spirnum)；[c] *Desulfotomaculum*。

糖体已有报道，但不是 DNA。在对嗜热脂肪芽孢杆菌核糖体的一项研究中，没有发现可以用以解释它们热稳定性的蛋白质的异常化学特性[27]，另一项研究中也没有发现嗜热脂肪芽孢杆菌和大肠杆菌核糖体的表面纤丝 (surface filaments) 在大小或排列上有显著的差异性[4]。已证实 rRNA 的碱基构成影响热稳定性。在对 19 株菌的研究中发现，随着最高生长温度的提高，rRNA 分子的 G—C 含量增加，而 A—U 含量随之下降[37]。G—C 含量的增加使氢键数量增加，有利于结构的更加稳定。另一方面，嗜热菌和嗜温菌中的可溶性 RNA (soluble RNA) 的热稳定性似乎是相似的。

16.6.3 鞭毛 (Flagella)

嗜热菌的鞭毛比嗜温菌的鞭毛更具耐热性，前者在温度高达 70℃的情况下还保持结构的完整，而后者在 50℃时就已解体[23,25]。嗜热菌的鞭毛对脲和乙酰胺的抵抗作用要比嗜温菌的强，这说明在嗜热菌鞭毛中存在更为有效的氢键。

16.7 嗜热菌的其它有关方面

16.7.1 营养需求

嗜热菌往往比生长在嗜热温度下的嗜温菌有更高的营养需求。虽然有关嗜热菌这方面的研究还不是很多，但培养温度升高对营养需求发生改变的原因可能是高温使菌代谢复合物的能力有所下降。培养温度的升高对某些酶系的影响较大，也会影响酶合成的整

个过程。

16.7.2 氧气分压

氧气分压影响嗜热菌的生长。当培养温度升高时，微生物的生长速率提高，因此，对培养介质的氧气要求也随之提高。而随着温度升高，培养介质中 O_2 的溶解率却有所降低，这被某些研究者认为是嗜热菌在培养介质中生长时最重要的生长限制因素之一。Downey[44]研究表明，在嗜温菌生长温度范围内（培养基）所拥有的氧气浓度为 143～240μmol/L 及附近值时最适合于嗜热菌的生长。可以设想，正是由于嗜热菌能在高温下有效地利用 O_2，所以它们才有在高温下生长的能力，而这种能力对嗜温菌和嗜冷菌来说是缺乏的。但这个观点还需用进一步的实验数据来证实。

16.7.3 细胞脂质

细胞脂质的状态影响嗜热菌的生长。因为细胞脂质不饱和程度的增加是与嗜冷菌的生长相关联的，这就有理由相信，嗜热菌生长中存在着与此相反的作用。这种观点在许多学者研究中得到了认同。Ganhran[17]的研究表明：嗜温菌在超出其最高生长温度范围的温度下生长时，其细胞脂质含量下降，并且脂质的饱和度也提高。根据这位作者的观点，微生物在其脂质凝固点温度以下时即不能生长。Marr 和 Ingraham[29]研究表明：当大肠杆菌的生长温度上升时，其脂质中饱和脂肪酸的比例有渐进地增长，而不饱和脂肪酸比例则相应地降低。在大量各类动物和植物中也发现：在生长温度上升时，不饱和脂肪酸的比例通常都会降低。这是因为饱和脂肪酸可形成比不饱和脂肪酸更为牢固的疏水键。在饱和脂肪酸中又以具支链的脂肪酸为主。现已证实，两种嗜热芽孢菌在生长温度提高时，优先合成支链的十七碳脂肪酸，不饱和脂肪酸最终全部被分解[47]。

16.7.4 细胞膜

细胞膜的性质影响嗜热菌的生长。Brack[9]指出：嗜热菌嗜热特性的分子机理更可能与细胞膜的功能和稳定性有关，而与特殊大分子的性质关系较少。同时他认为，没有证据可以证明微生物的热致死是由于蛋白质或其它大分子的热失活引起的，而人们普遍接受的观念是：蛋白质等的变性是菌热致死的原因。根据 Brock 的观点，对各种微生物热力致死曲线的分析表明：热对一些诸如细胞膜等一些大结构物质的影响作用符合一级反应规律，因为膜上一个小洞的存在就可导致细胞成分的流失，继而发生死亡。Brack 又指出：热致死的原因如果是热敏性酶或核糖体的失活造成的，那么由于在细胞中有许多它们的复制体（copies），那么菌的热致死不太可能只是一种简单的一级反应动力学过程。经历“冷休克”细胞会造成紫外线吸收和其它物质的流失，这现象也许可以解释高温下细胞膜破坏而造成菌死亡的原因。

因为许多动物体在其体温达 40～45℃时即死亡，大多数嗜冷菌也在此温度区域死亡，因此认为致命性的伤害来自于细胞或细胞膜中脂质成分的融化不是没有道理的，而且这一假设被许多学者的实验结果所证实。细胞膜是由多层蛋白质包裹的脂质层组成的，并且细胞膜生化功能的发挥有赖于脂质层。这种结构的破坏将使细胞遭到伤害，也许还

会直接致死。考虑到上文已提及的细胞脂质饱和度的变化情况，细胞膜对菌在高温下生长和残存中的作用是至关重要的。

16.7.5 温度的影响

Brack[9]已经注意到这样一个事实：嗜热菌在它们的最适生长温度下，其生长速率明显没有人们所预料的或通常认为的那么快。一定温度范围内，嗜热菌阿雷纽斯图的生长（Arrhenius Plots）与大肠杆菌的比较结果表明，嗜温菌的（酶作用）效率要更高一些。Brock 指出，因为热稳定性，嗜热菌酶系的作用效率自然要比嗜温菌的低。即嗜热菌为了其全部的存活而不得不放弃生长速率。

16.7.6 遗传学（Genetics）

McDonald 和 Matney[31]一项重要的发现使人们对嗜热性的遗传基础有了进一步的了解。他们将在 55℃时生长的菌的 DNA 片段转至在 50℃以上不能生长的枯草芽孢杆菌生长细胞中，以改变其嗜热特性。转变成对热更敏感的菌株的机率只有万分之一。他们发现，只有 20%～30%转基因菌株保留着较高水平的链霉素抗性。这些结果显示，链霉素抗性的遗传位点与 55℃生长的遗传位点是高度相关的。

显然对于微生物嗜热性的基本机理已了解许多，但是对嗜高温生长的确切机理还不清楚。兼性嗜热菌，如凝结芽孢杆菌，嗜热机理同专性嗜热菌一样令人困惑。兼性嗜热菌兼有嗜温和嗜热菌的代谢类型。对在 37℃和 55℃下生长良好的芽孢菌属菌进行代谢类型研究时，Bausum 和 Matney[6]发现，这些菌在 44～52℃之间由嗜温性向嗜热性转变。

16.8 罐头食品的腐败

虽然罐头食品生产的目标是杀灭微生物，但在特殊的情况下，罐头食品仍会存在微生物引起的腐败。造成这些问题的主要原因有罐头杀菌不足、冷却不完全，由于罐头泄漏从接缝处造成罐头的污染和加工前的腐败。由于一些罐头食品只经过低热处理，所以在对这些食品进行检验时，可能发现大量不同类型的微生物的存在。

对罐头食品按其酸性大小进行下列的分类，有助于判断罐头食品的腐败类型：

低酸：pH＞4.6。包括肉和海产品、牛乳、某些蔬菜（玉米、利马豆）、肉和蔬菜的混合食品等。嗜热平酸菌（嗜热脂肪芽孢杆菌、凝结芽孢杆菌）、硫化物腐败菌（致黑梭状芽孢杆菌、双酶梭状芽孢杆菌）和（或）产气腐败菌（*Thermoanaerobaeterium thermosaccharolyticum*）都会造成这类食品的腐败。嗜温腐败菌包括腐烂厌氧菌（尤其是 P. A. 3679 型）。在有分解蛋白的肉毒梭状芽孢杆菌存在的情况下，可能会导致产品的腐败及产毒。中酸食品的 pH 在 5.3～4.6 之间，而低酸食品 pH≥5.4。

酸性：pH3.7～4.0 至 4.6。这类食品是指诸如番茄、梨和无花果等水果食品。引起这类食品腐败的微生物有嗜热腐败菌包括凝结芽孢杆菌，嗜温腐败菌包括多黏芽孢杆菌、*B*-致黑芽孢杆菌（*B. betanigrificans*）、巴氏固氮梭状芽孢杆菌、酪酸梭状芽孢杆菌、乳

酸杆菌和其它菌。

高酸性：pH＜4.0～3.7。这类食品包括水果及水果和蔬菜制品——柚子、大黄叶梗、泡菜、腌菜等。腐败通常是由不形成芽孢的嗜温菌——酵母、霉菌和（或）乳酸细菌引起的。

引起罐头食品腐败的细菌可进一步按其特性分为：

①嗜温菌

a. 腐烂厌氧菌

b. 丁酸厌氧菌

c. 嗜酸平酸菌

d. 乳酸菌

e. 酵母菌

f. 霉菌

②嗜热菌

a. 产生硫化物的嗜热厌氧菌

b. 平酸孢子

c. 不产生硫化物的嗜热厌氧菌

这些菌引起罐头食品腐败的现象列于表 16.8。

表 16.8　　酸性和低酸性罐头食品的腐败现象

微生物类型	罐头的外观和现象	产品的状态
	酸性食品	
1. 凝结芽孢杆菌（平酸菌；番茄汁）	平罐；真空度略有变化	pH 少许变化；风味、气味异常
2. 丁酸厌氧菌（番茄、番茄汁）	胀罐；可能爆裂	发酵；丁酸味
3. 非芽孢菌（主要为乳酸菌）	胀罐；通常胀裂	酸味
	低酸性食品	
1. 平酸菌	平罐；在贮存中真空度可能失去	一般外观无变化；pH 相当低酸；可能有些不正常的气味；有时汤汁混浊
2. 嗜热厌氧菌	胀罐；可能爆裂	发酵的、酸味、奶酪味或丁酸味
3. 硫化腐败菌	平罐；H_2S 被产品吸收	常变黑，并有臭鸡蛋味
4. 厌氧腐败菌	胀罐；可能爆裂	部分可能腐化；pH 略高于正常值；典型的腐败味
5. 需氧芽孢菌（稀有类型）	平罐；通常无胀罐现象，但使用 NO_3 和糖的腌制肉例外	凝固浓缩乳状、黑甜菜状

由酵母、霉菌和细菌引起的高酸性和其它罐头食品腐败方面，某些食品的腐败与这些微生物中的某些菌有密切关系。如炼乳圆酵母（*Torula Lactis condensi*）和 *T. globosa* 会使甜炼乳产气或产气腐败，而甜炼乳装罐后是不再杀菌的。霉菌中匍匐曲霉与甜炼乳

表面“钮扣”状凝块的形成有关。在番茄酱、辣酱油等类似产品中，短乳杆菌可产生各种类型的发酵作用。已经证实，肠膜状明串珠菌的生长是导致罐装菠萝产气腐败和罐装桃子发黏的原因。纯黄丝衣霉可以导致瓶装和罐装水果的腐败。它可使水果中的果胶降解从而使水果解体[5]。*Torula stellata* 是导致苦柠檬罐头腐败的原因，它甚至可在 pH2.5 下生长[39]。

酵母和霉菌有时可导致冷冻浓缩橙汁的腐败。Hays 和 Reisler[2]对由细菌引起腐败的这类产品的样品进行了分析，腐败的橙汁有霉味或奶酪味，并伴随有风味的改变。从腐败的产品中分离得到了植物乳杆菌运动变种（*L. plantarum Var. mobilis*）、短乳杆菌、肠膜状明串球菌、戊糖明串珠菌。通过在新鲜橙汁中接入上述分离菌可重现橙汁腐败的特征。

嗜热腐败菌的最低生长温度对判断罐头腐败的原因有重要意义。凝结芽孢杆菌在 25℃时生长缓慢，而在 30～35℃时生长迅速。嗜热脂肪芽孢杆菌的最适生长温度在 65℃左右，在这温度下其光滑型变种的生长代时要比粗糙型变种的短，但它在 37℃时即不能生长[1]。*T. thermosaccharolyticum* 适宜生长在 37℃，但在 30℃时即不能生长。

未开启罐头的外形对判断罐头食品腐败的原因也同样具重要意义。正常罐头的顶端是平的或稍有凹面。当微生物生长并产气时，罐头内产生了一系列外观可见的变化。罐头在敲击或加热时（一端）有凸起的变化称为隐胀（flipper）。初胀（springer）现象是指罐头两端有凸起现象，但在压击两端时，罐头一端或两端仍可保持凹面，或一端被压进时，另一端会凸起。软胀（soft swell）是指罐头两端有凸起现象，但可用手指将凸起部分压平。硬胀（hard swell）是指两端凸起的现象，但这种凸出已无法用手指压平。这些现象是连续发生的，在判定腐败的类型中具一定的应用价值。隐胀和初胀罐头可以在适于该类食品 pH 和温度下连同包装进行培养，以使那些可能存在的菌进一步生长（从而判断是否是由微生物引起的）。罐头产生这些现象并不总是由微生物引起的。软胀通常是由微生物腐败引起的，硬胀更是如此。然而在高酸性食品中，硬胀通常是氢胀，后者是由高酸性食品和罐头铁反应后产生 H_2 引起的。在腐败罐头食品中另两类经常产生的气体是 CO_2 和 H_2S，两者均是由微生物代谢产生的。H_2S 气体可以通过其特殊性气味加以确定，而 CO_2 和 H_2 可用下述方法加以确定。将玻璃或塑料管与装有一大的橡胶塞的打孔器连接成一套测定装置。将这套装置的自由端插入一支装满稀 KOH 液的试管中，并将其翻转放入一充满稀 KOH 液的烧杯中。当用打孔器打开罐头一端时，流出气体将取代试管内的 KOH 液。在从烧杯移去开口端之前，用拇指将试管顶端压紧。测 CO_2 时，摇动试管，如手指被吸住，说明有真空存在，也就说明有 CO_2 存在（因为 CO_2 可与 KOH 发生反应）。试验 H_2 是否产生时，重复试验，并将一根火柴靠近试管的顶部。快速移去手指，发出“啪”的声音表明有 H_2 存在。在一些腐败罐头食品中，这两种气体都可能出现。罐头食品的“泄漏型”腐败是一些非芽孢菌引起的，而这些非芽孢菌本不应该存在于经过正常热处理的罐头食品中。这些菌在罐头杀菌冷却开始时从罐头的密封不良处进入罐内，从而导致罐头的腐败。造成罐头“泄漏”型腐败的菌可在罐内或冷却水中检出。如果罐头冷却水的细菌数＜100 个/mL，即可将这个问题出现的概率降至最低水平。这种类型的腐败与杀菌不足造成的腐败的差异性见表 16.9。

表 16.9 由于杀菌不足和密封不良造成罐头腐败的一些特征

	杀菌不足	密封不良
罐头	平或凸；封口通常良好	凸；可能有密封缺陷
产品外观	稀薄（sbppy）或发酵态	多泡沫发酵；黏稠
气味	正常，酸或腐臭味，但通常是恒定的	酸、粪臭味，罐头与罐头之间有差异
pH	通常不变	变化范围大
显微镜观察	纯菌，形成芽孢；	混合菌，通常是杆菌和球菌
和培养特点	在36.7℃或（和）45℃下生长；在特殊培养基中有生长特征，例如：酸化琼脂（番茄汁）	只在一般温度下生长
纪事（History）	腐败通常只限于某批罐头中，在酸性产品中，判断可能缺少明晰的界限，相似的菌可能存在于杀菌不足和密封不良的罐头中	腐败现象比较分散（Spoilage scattered

参 考 文 献

[1] Amelunxen, R. F., and A. L. Murdock. 1978. Microbial life at high temperatures: mechanisms and molecular aspects. In *Microbial Life in Extreme Environments*, ed. D. J. Kushner, 217～278. New York: Academic Press.

[2] Ansley, S. B., L. L. Campbell, and P. S. Sypherd. 1969. Isolation and amino acid composition of ribosomal proteins from *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 98: 568～572.

[3] Baird-Parker, A. C., M. Boothroyd, and E. Jones. 1970. The effect of water activity on the heat resistance of heat sensitive and heat resistant strains of salmonellae. *J. Appl. Bacteriol.* 33: 515～522.

[4] Bassel, A., and L. L. Campbell. 1969. Surface structure of *Bacillus stearothermophilus* ribosomes. *J. Bacteriol.* 98: 811～815.

[5] Baumgartner, J. G., and A. C. Hersom. 1937. *Canned Foods*. Princeton, NJ: D. Van Nostrand.

[6] Bausum, H. T., and T. S. Matney. 1965. Boundary between bacterial mesophilism and thermophilism. *J. Bacteriol.* 90: 50～53.

[7] Beaman, T. C., and P. Gerhardt. 1986. Heat resistance of bacterial spores correlated with protoplast dehydration, mineralization, and thermal adaptation. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 1242～1246.

[8] Beaman, T. C., J. T. Greenamyre, T. R. Corner, H. S. Pankratz, and P. Gerhardt. 1982. Bacterial spore heat resistance correlated with water content, wet density, and protoplast/sporoplast volume ratio. *J. Bacteriol.* 150: 870～877.

[9] Brock, T. D. 1967. Life at high temperatures. *Science* 158: 1012～1019.

[10] Burgos, J., J. A. Ordóñez, and F. Sala. 1972. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus cereus* and *Bacillus licheniformis* spores. *Appl. Microbiol.* 24: 497～498.

[11] Carpenter, P. L. 1967. *Microbiology*, 2d ed. Philadelphia: W. B. Saunders.

[12] Corry, J. E. L. 1974. The effect of sugars and polyols on the heat resistance of salmonellae. *J.*

Appl. Bacteriol. 37: 31～43.

[13] Cunningham, F. E., and H. Lineweaver, 1965. Stabilization of egg-white proteins to pasteurizing temperatures above 60℃. *Food Technol.* 19: 1442～1447.

[14] Downey, R. J. 1966. Nitrate reductase and respiratory adaptation in *Bacillus stearothermophilus*. *J. Bacteriol.* 91: 634～641.

[15] Fields, M. L. 1970. The flat sour bacteria. *Adv. Food Res.* 18: 163～217.

[16] Garcia, M. L., J. Burgos, B. Sanz, and J. A. Ordoñez. 1989. Effect of heat and ultrasonic waves on the survival of two strains of *Bacillus subtilis*. *J. Appl. Bacteriol.* 67: 619～628.

[17] Gaughran, E. R. L. 1947. The saturation of bacterial lipids as a function of temperature. *J. Bacteriol.* 53: 506.

[18] Gillespy, T. G. 1962. The principles of heat sterilization. *Recent. Adv. Food. Sci.* 2: 93～105.

[19] Goepfert, J. M., I. K. Iskander, and C. H. Amundson. 1970. Relation of the heat resistance of salmonellae to the water activity of the environment. *Appl. Microbiol.* 19: 429～433.

[20] Hansen, N. H., and H. Riemann. 1963. Factors affecting the heat resistance of nonsporing organisms. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 311～333.

[21] Hays, G. L., and D. W. Riester. 1952. The control of "off-odor" spoilage in frozen concentrated orange juice. *Food Technol.* 6: 386～389.

[22] Jelen, P. 1982. Experience with direct and indirect UHT processing of milk— A Canadian viewpoint. *J. Food Protect.* 45: 878～883.

[23] Koffler, H. 1957. Protoplasmic differences between mesophiles and thermophiles. *Bacteriol. Rev.* 21: 227～240.

[24] Koffler, H., and G. O. Gale. 1957. The relative thermostability of cytoplasmic proteins from thermophilic bacteria. *Arch. Biochem. Biophys.* 67: 249～251.

[25] Koffler, H., G. E. Mallett, and J. Adye. 1957. Molecular basis of biological stability to high temperatures. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 43: 464～477.

[26] Koizumi, J. I., M. Zhang, T. Imanaka, and S. Aiba. 1990. Does single-amino-acid replacement work in favor of or against improvement of the thermostability of immobilized enzyme? *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3612～3614.

[27] Levinson, H. S., and M. T. Hyatt. 1964. Effect of sporulation medium on heat resistance, chemical composition, and germination of *Bacillus megaterium* spores. *J. Bacteriol.* 87: 876～886.

[28] López, P., F. J. Sala, J. L. de la Fuente, S. Condon, J. Raso, and J. Burgos. 1994. Inactivation of peroxidase, lipoxygenase, and polyphenol oxidase by manothermosonication. *J. Agric. Food Chem.* 12: 252～256.

[29] Marr, A. G., and J. L. Ingraham. 1962. Effect of temperature on the composition of fatty acids in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 84: 1260～1267.

[30] Matsubara, H. 1967. Some properties of thermolysin. In *Molecular Mechanisms of Temperature Adapation*, ed. C. L. Prosser, Pub. No. 84, 283～294. Washington, DC: American Association for the Advancement of Science.

[31] McDonald, W. C., and T. S. Matney. 1963. Genetic transfer of the ability to grow at 55℃ in *Bacillus subtilis*. *J. Bacteriol.* 85: 218～220.

[32] Montville, T. J., and G. M. Sapers. 1981. Thermal resistance of spores from pH elevating strains

of *Bacillus licheniformis*. *J. Food Sci.* 46: 1710～1712.

[33] Nakashio, S., and P. Gerhardt. 1985. Protoplast dehydration correlated with heat resistance of bacterial spores. *J. Bacteriol.* 162: 571～578.

[34] Ng, H., H. G. Bayne, and J. A. Garibaldi. 1969. Heat resistance of *Salmonella*: The uniqueness of *Salmonella senftenberg* 775W. *Appl. Microbiol.* 17: 78～82.

[35] Ordoñez, J. A., M. A. Aguilera, M. L. Garcia, and B. Sanz. 1987. Effect of combined ultrasonic and heat treatment (thermoultrasonication) on the survival of a strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Dairy Res.* 54: 61～67.

[36] Ordoñez, J. A., and J. Burgos. 1976. Effect of ultrasonic waves on the heat resistance of *Bacillus* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 183～184.

[37] Pace, B., and L. L. Campbell. 1967. Correlation of maximal growth temperature and ribosome heat stability. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 57: 1110～1116.

[38] Palacios, P., J. Burgos, L. Hoz, B. Sanz and J. A. Ordóñez. 1991. Study of substances released by ultrasonic treatment from *Bacillus stearothermophilus* spores. *J. Appl. Bacteriol.* 71: 445～451.

[39] Perigo, J. A., B. L. Gimbert, and T. E. Bashford. 1964. The effect of carbonation, benzoic acid, and pH on the growth rate of a soft drink spoilage yeast as determined by a turbidostatic continuous culture apparatus. *J. Appl. Bacteriol.* 27: 315～332.

[40] Schmitt, H. P. 1966. Commercial sterility in canned foods, its meaning and determination. Assoc. *Food Drug Off. U. S., Quart. Bull.* 30: 141～151.

[41] Srivastava, R. A, K., and J. N. Baruah. 1986. Culture conditions for production of thermostable amylase by *Bacillus stearothermophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 179～184.

[12] Stumbo, C. R. 1973. *Thermobacteriology in Food Processing*, 2ed. New York: Academic Press.

[43] Stumbo, C. R., J. R. Murphy, and J. Cochran. 1950. Nature of thermal death time curve for P. A. 3679 and *Clostridium botulinum*. *Food Technol.* 4: 321～326.

[14] Sugiyama, H. 1951. Studies on factors affecting the heat resistance of spores of *Clostridium botulinum*. *J. Bacteriol.* 62: 81～96.

[15] Tanner, F. W., and G. I. Wallace. 1925. Relation of temperature to the growth of thermophilic bacteria. *J. Bacteriol.* 10: 421～137.

[46] Tendler, M. D., and P. R. Burkholder. 1961. Studies on the thermophilic *Actinomycetes*. I. Methods of cultivation. *Appl. Microbiol.* 9: 394～399.

[47] Weerkamp, A., and W. Heinen. 1972. Effect of temperature on the fatty acid composition of the extreme. thermophiles, *Bacillus caldolyticus* and *Bacillus caldotenax*. *J. Bacteriol.* 109: 443～416.

[48] White, H. R. 1963. The effect of variation in pH on the heat resistance of cultures of *Streptococcus faecalis*. *J. Appl. Bacteriol.* 26: 91～99.

[49] Williams, O. B., and W. J. Robertson. 1934. Studies on heat resistance. VI. Effect of temperature of incubation at which formed on heat resistance of aerobic thermophilic spores. *J. Bacteriol.* 67: 377～378.

[50] Wisdom, C., and N. E. Welker. 1973. Membranes of *Bacillus stearothermophilus*. Factors affecting protoplast stability and thermostability of alkaline phosphatase and reduced nicotinamide adenine dinucleotide oxidase. *J. Bacteriol.* 111: 1336～1345.

[51] Xezones, H., and I. J. Hutchins. 1965. Thermal resistance of *Clostridium botulinum* (62A) spores as affected by fundamental food constituents. *Food Technol.* 19: 1003～1005.

17. 食品干燥保藏

食品干藏的基本机理是微生物的生长和酶活力的表现需要水的参与。用这种方法保存食品必须降低食品水分至某一含量以下，直至可以抑制引起食品腐败和中毒的微生物的生长。通常将含水量在25%以下或A_w值在0.00～0.60之间的食品称为干燥、脱水或低水分含量（LM）食品，这些食品是传统的干燥食品。冷冻干燥食品也在属此类。另一类食品其水分含量在15%～50%之间，A_w值在0.60～0.85，且同样具有一定的货架稳定期。这类食品称半干（IM）食品中。本部分论述的是IM和LM食品的一些有关微生物学方面的问题。

17.1 低水分食品的干燥和制作

最早采用的食品干燥方法是将新鲜食品曝晒于日光之下直至干燥。通过这种日光干燥的方法，在温度和相对湿度适宜的条件下，某些食品可以较好地被保存。葡萄、李子、无花果、杏仁等水果可用此法干燥。在大批量生产的情况下，这种方法需要很大的场地。工业化生产中最常使用的干燥方法有喷雾干燥、滚筒薄膜干燥、蒸发干燥和冷冻干燥。

除个别情况外，食品在干燥前的预处理方式与冷冻食品的基本相同。李子等水果的干燥，先将水果在0.1%～1.5%的热碱液中进行浸泡处理。这种处理在采用日光干燥时更为必要。浅色水果和某些蔬菜要用SO_2进行处理，使其吸收的SO_2量在1000～3000mg/kg。这种处理有利于产品的保色、维生素的保存，并可降低原料的微生物数量、防止贮存时发生产品变质。干燥后，通常要对干果进行65.6～85℃ 30～70min的巴氏杀菌。

与冷冻蔬菜食品的预处理过程相似，漂洗或热烫是干燥前必不可少的一步。根据产品不同，热烫时间控制在1～8min。这一过程的主要作用是杀灭酶，以防止在成品中发生由于酶活力残存而引起的一些不利的化学变化。叶用蔬菜热烫时间通常比豌豆、豆类及胡萝卜的要短。对许多蔬菜的干燥，合适的处理温度为60～62.8℃。为达到理想的贮存期和产品质量，蔬菜的水分含量应控制在小于4%。许多蔬菜如果用SO_2或亚硫酸盐处理则可变得更加稳定。通常采用隧道式，带式或箱式干燥设备对蔬菜进行干燥。

肉类在干燥前通常要进行蒸煮。牛肉和猪肉干燥后成品的水分含量控制在约为4%。

牛乳既可以全脂乳形式也可以脱脂乳形式进行干燥。滚筒干燥或喷雾干燥均可对乳进行脱水干燥。全脂乳脱去约60%的水即可生产淡炼乳，其乳糖含量约为11.5%。蒸发前加入蔗糖或葡萄糖即可生产甜炼乳，其总糖的平均含量约为54%，或糖水溶液的浓度超过64%。甜炼乳的良好稳定性部分来自于糖对部分水分的束缚作用，而使其无法被微生物生长所利用。

蛋类可干制成全蛋粉、蛋黄粉或蛋白粉。干燥前降低蛋中葡萄糖含量有助于脱水稳

定性的提高。喷雾干燥是这类产品生产中最常用的方法。

在冷冻干燥（冷冻升华干燥）过程中，蔬菜冷冻前要先经漂洗、热烫，而肉类要先经预煮。食品材料的冻结和解冻速度受下列因素影响：

①产品与冷却或加热介质之间的温度差；

②热源与产品、产品内部之间的热能传递方式（传导、对流、辐射）；

③产品包装的类型、尺寸和形状；

④产品尺寸、形状和热力学特征。

快速冷冻法生产的产品其质量要优于慢速冷冻法生产的产品。快速冷冻可形成小的冰晶体，对食品质构的机械损伤较小。解冻后，快速冷冻的产品能吸收更多的水分。与慢速冷冻相比，其品质与新鲜品更为接近。冻结后，以冰形式存在的水通过升华作用被除去。这一过程是通过不同方式的加热与真空来实现的。蛋白质类食品中的水分可分为两类：可冻结的和不可冻结的水。在低于－30℃下不冻结的这部分水称为不可冻结水（结合的）。干燥的第一阶段除去的主要是可冻结水（游离水），除去的水量约为总水分的40%～95%。虽然部分结合水的除去发生在整个干燥过程，但最后阶段去除的水一般是结合水。除非原料在冷冻干燥前进行了热处理，否则冷冻干燥食品仍具酶活力。对冷冻干燥肉进行研究后发现：有40%～80%的酶活力残存，在－20℃贮存16个月后酶的活力依然存在[24]。冷冻干燥食品的最终水分控制在大约在2%～8%或其 A_w 值在0.10～0.25[36]。

冷冻干燥较高温真空干燥更为先进。与前者相比，后者的缺点如下[117]：

①明显的固形物干缩；

②干燥固形物时可溶性成分迁移至表面；

③蛋白质变性程度大；

④表面硬化，在固形物表面形成一层相对较硬、不渗水的壳层，降低了脱水和复水的速度；

⑤当干燥流质溶液时，形成较硬，且不渗水的固体；

⑥热敏性食品材料发生不利的化学反应；

⑦挥发性成分损失过多；

⑧由于一个或更多其它原因造成的复水困难。

17.2 干燥对微生物的作用

虽然在干燥过程中有部分微生物被杀灭，但这一过程并不能对微生物造成致命的杀灭。事实上，在干燥食品中可检出许多类型的微生物，在原料质量差或干制过程中没有严格按要求操作时尤为如此。

细菌的生长需要相对较高的水分含量，而酵母的要求则较低，霉菌更低。因为大多数细菌生长的 A_w 值要求在0.90以上，所以不太可能引起干制食品的腐败。关于干制食品的稳定性，Scott[24]提出的 A_w 值和腐败可能性的关系是：A_w 值在0.8～0.85之间，在1～2星期内各种真菌可快速造成食品的腐败变质；A_w 在0.75时，腐败延迟，能在这类

食品中造成腐败的菌较少；A_w 在 0.7 时，发生变质的时间大大延迟，在延迟的保存期内可以不发生腐败；A_w 在 0.65 时，已知的可在此条件下生长的微生物非常少，保存期达两年还不致于发生腐败。一些学者建议：如生产的干品需要有几年保存期的话，则产品的最终 A_w 值应控制在 0.65～0.75 之间，而大多数人建议控制在 0.70。

A_w 值在 0.9 左右时，最可能生长的是酵母和霉菌。该值已接近大多数酵母生长的最低 A_w 值。虽然 A_w 小于 0.65 时可阻止所有的腐败发生，但也有例外，一些霉菌在 A_w 为 0.60～0.62 还可以缓慢生长。适高渗压酵母，例如鲁氏接合酵母中的某些菌株，在特定条件下可在 A_w 为 0.65 时生长。在干制食品中最有可能引起产品质量问题的微生物是霉菌，而在低 A_w 时最常见的是灰绿曲霉。霉菌及酵母发芽和生长的最低 A_w 见表 17.1。Pitt 和 Christian[26] 发现：在干燥的，但水分含量相对较高的李子中，主要的腐败菌是灰绿曲霉和 *Xeromyces bisporus*。在 A_w 为 0.605 时，*Xeromyces bisporurs* 的侧生孢子在 120d 内可以萌发。一般有性和无性孢子的形成需要较高的水分含量。

表 17.1　　引起食品腐败的酵母和霉菌发芽及生长的最低 A_w 值

微生物	最低 A_w	微生物	最低 A_w
产蛋白假丝酵母	0.94	涎沫假丝酵母	0.90
灰色葡萄孢	0.93	*vernalis* 复膜孢酵母	0.89
葡枝根霉	0.93	柑橘交链孢霉	0.84
Musor spinisus	0.93	灰绿曲霉	0.70
Candida scottii	0.92	刺孢曲霉	0.64
茵异丝孢酵母	0.91	鲁氏接合酵母	0.62

作为干制品贮藏稳定性的一项指标“警戒水分”(alarm water) 含量是指要避免霉菌生长的最高水分含量。虽然利用这些数值有有利的一面，但执行时必须谨慎，因为即使只有升高 1%，在某些情况下也可能造成灾难性的损失[29]。某些食品的警戒水分含量列于表 17.2 中。在冷冻干燥食品中，最重要的一条是降低水分含量至 2%。但 Burke 和 Decareau 指出：对某些在较高水分含量下可以保藏良好的食品而言，这样低的水分含量似乎要求太高，不必花费代价除去最后这一部分水分。

表 17.2　　各种食品的“警戒水分”含量

食　品	水分含量/%	食　品	水分含量/%
全脂乳粉	约 8	脱脂干肉	15
脱水全蛋	10～11	豆类	15
小麦粉	13～15	脱水蔬菜	14～20
大米	13～15	淀粉	18
乳粉（脱脂）	15	脱水水果	18～25

注：R.H70%，温度 20℃。

虽然在干燥过程中可杀死一些微生物，但可残存酵母和霉菌的孢子及许多革兰氏阳性和阴性菌。May 和 kelly[23]研究发现：经过冷冻干燥的鸡肉，在室温下复水后仍可检测出大约 32%的原有菌。这些研究者同时证实：冷冻干燥前加入的金黄色葡萄球菌在特定条件下可以残存。已有报道，一些或全部食物传播的寄生虫，例如 *Trichinella spiralis*（旋毛虫）在干燥后可残存[31]。干燥食品生产中产品的总菌数要求控制在小于 10^5/g。通常认为干燥食品的大肠菌数应为零或几乎为零，并且除了可能存在的少量产气荚膜杆菌外，干燥食品中不应含有引起食物中毒的菌。除了在热烫或预煮中被杀灭的细菌外，在冷冻干燥中致死的菌体相对较少。而冻结过程杀灭的菌要比脱水过程杀灭的多。在冻结过程中，5%～10%之间的水与食品基质中的其它成分保持结合状态，这部分水在干燥中也被去除。干燥对微生物的致死或损伤的机理可能是静冷（still-frozen）过程中的变性作用、冻结去除结合水的作用及盐或低共熔点物溶液形成的水合物的重结晶作用的结果。脱水过程发生微生物致死作用时，干燥的第一阶段其致死速度最快。有报道：幼龄菌比老龄菌对干燥的敏感性更强[14]。

众所周知，冷冻干燥是保存菌种的方法之一。对菌进行冷冻干燥后其活力可保存一定的时间。通过测定冷冻干燥 21 年后的 277 种细菌、酵母和霉菌的活力，Davis[10]发现只有 3 株菌失活。

17.3 干燥食品的贮存稳定性

在无真菌生长的情况下，脱水食品也易发生某些化学变化，从而导致食品在保质期内发生变质。在含有脂肪和 O_2 的干制食品中，氧化酸败是一种常见的化学性败坏。含还原糖的食品会发生称之为美拉德反应的色泽变化，即非酶褐变。这个过程的发生是由还原糖的羰基和蛋白质及氨基酸的氨基相互反应，再经过一系列其它复杂的反应引起的。美拉德褐变是水果和蔬菜生产中最不希望发生的。这不仅仅是因为它造成产品色泽的改变，同时还使一些易发生该反应的果蔬食品带有苦味。冷冻干燥食品在水分含量大约 2%时也会发生褐变，因此，其水分含量应控制在低于 2%。

就 A_w 而言，水果和蔬菜产品在 A_w 为 0.65～0.75 之间具最高的褐变反应速率，而对脱脂乳粉的褐变，其最大反应速率发生在 A_w 约为 0.70 时[36]。干制食品中发生的其它化学变化包括：蔬菜中维生素 C 的损失、脱色反应由于结构的变化而导致的干制品的不能完全复水以及复水、蒸煮后的产品仍具韧性等。

在干制食品中，对一种或多种上述化学变化有利的条件通常也对所有变化有利，因此，控制一种化学变化的方法在不同程度上对抑制其它变化也有效。干制食品中将发生化学变化的可能性降至最低的方法至少有下述 4 种：

①控制水分含量尽可能的低。Gooding[14]指出。将卷心菜的水分含量从 5%降至 3%，在 37℃下可使贮存期延长一倍。

②尽可能地降低还原糖的含量。这些化合物直接参与非酶褐变，已证实：降低它们的含量，可以提高贮存稳定性。

③漂洗时，漂洗用水中含浸出的可溶固形物含量尽可能低。Cooding[14]发现：在同一

水中对蔬菜进行连续漂洗会增加褐变的几率。其原因是各种浸出物（也许是还原糖和氨基酸）以相对高的水平吸附于被处理产品的表面。

④使用 SO_2。在脱水干燥前对蔬菜用 SO_2 进行处理，可以保护维生素 C 和延缓褐变反应。对 SO_2 延缓褐变反应的确切机理还不是很清楚，但明显不是阻断已糖的还原基。有人认为 SO_2 也许是作为自由基受体起作用。

在抑制干制品真菌腐败中，贮存环境的相对湿度是要着重考虑的方面之一。如包装不良并贮存于相对湿度高的环境下，干制品将从空气中吸取水分，直至重新建立某种程度上的水分平衡。由于干制品的表面首先吸收水分，腐败变质不可避免；由于霉菌是需氧菌，因此，表面生长的微生物主要以霉菌为主。

17.4 半干食品（IMF）

半干食品的特点是：水分含量大约在 15%～50%，A_w 值在 0.60～0.85 之间。这类食品在室温下的保质期不同。虽然该类食品的生产源自于 20 世纪 60 年代早期对半干狗食的开发和销售，但是满足该类食品基本要求、用于人类消费的半干食品的生产也已有许多年的历史。为区别于新近开发的 IMF，将这类食品称为传统 IMF。在表 17.3 中列出了一些传统型 IMF 食品及其 A_w 值。所有这些食品其 A_w 值均较低，低 A_w 值主要是通过解吸、吸附作用去水和（或）通过添加诸如盐、糖等一些许可的食品添加剂取得的。新开发的 IMF 的特点不但表现在其 A_w 值在 0.60～0.85 之间，而且还使用了一些诸如甘油、乙二醇、山梨醇及蔗糖等保湿剂和诸如山梨酸盐、苯甲酸盐等抑真菌剂。

表 17.3 传统半干食品

食品产品	A_w 值	食品产品	A_w 值
脱水水果	0.60～0.75	蜂蜜	0.75
糕点、糕饼	0.60～0.90	浓缩水果汁	0.79～0.81
冷冻食品	0.60～0.90	果酱	0.80～0.91
糖、糖浆	0.60～0.75	甜炼乳	0.83
糖果	0.60～0.65	某些发酵香肠	0.83～0.87
商业用糕点馅	0.65～0.71	糖浆	0.90
某些谷物	0.65～0.75	某些成熟干酪	0.96
水果糕点	0.73～0.83	肝泥香肠	0.96

17.4.1 IMF 的生产

因为金黄色葡萄球菌是惟一能够在 A_w 在 0.86 左右时生长的，并具重要公共卫生意义的菌。因此，IMF 生产中制订的配方其水分含量控制在 15%～50%，并通过使用一些保湿剂使产品的 A_w 值低于 0.86，同时加入一些抗真菌剂来抑制大量的、在 A_w 值 0.70 以上可以生长的霉菌和酵母。降低 pH 也可进一步提高贮存稳定性。虽然这些都是制作 IMF

的基本原则，实际的制作过程和产品贮存稳定性的获得是相当复杂的。

第二部分 3 中讨论了食品体系中 A_w 值的计算方法。按 Raoult 的摩尔分数规则，溶液中水的物质的量除以溶液的物质的量即为 A_w[3]。

$$A_w = \frac{\text{水的物质的量}}{\text{水的物质的量} + \text{溶质的物质的量}}$$

例：1LH_2O 的物质的量为 55.5mol，假定其为纯水，则

$$A_w = \frac{55.5}{55.5 + 0} = 1.00$$

然而，如在 1LH_2O 中加入 1mol 的蔗糖，则

$$A_w = \frac{55.5}{55.5 + 1} = 0.98$$

这个公式可用于计算为达到特定要求的 A_w 值应加入的溶质物质的量。尽管上述计算公式是正确的，但它过分单纯化。因为作为食品，它是一种由多种成分，以不同含量组成的复杂体系。这些成分与水以及成分与成分之间以难以预料的方式相互作用着。例如蔗糖，其降低 A_w 的能力比预料的要高。因此，根据 Raoult 公式计算 A_w 也许是无意义的。

在 IMF 的生产中，吸附作用和解吸作用都可达到去除水分的目的。采用吸附方式时，食品首先被干燥（通常用冷冻干燥），然后在控制下进行再湿润（复水），直至达到所要求的成分构成。采用解吸方式时，将食品浸入高渗透压的溶液中，以便在平衡时达到所要求的 A_w 值[28]。虽然通过这两种方式都能达到相同的 A_w 值，但通过吸附作用生产的 IMF 比通过解吸作用生产的 IMF 具更高的抑制微生物的特性（见下述）。当食品材料的吸附等温线确定后，在同样 A_w 值下，有时吸附等温线显示的食品材料持水量要比解吸等温线显示的低。一种食品材料的吸附等温线反映的是食品材料由于相对湿度或其周围水蒸气的作用而吸收的水分量，即在一恒定温度下，经过平衡以后食品材料的持水量[21]，等温吸附可以是吸附作用也可以是解吸作用。达到同样 A_w 值，吸附等温线要比解吸等温线具有较大的水分含量，这种差异性被称为滞后效应。Lahaza[21]、sioan 等人[33]和其它作者对这些内容以及与 IMF 生产相关的其它物理性质作了专题论述，在这里不再进一步展开。IMF 配方的吸附特性、各种成分与水及各成分间的相互作用，各成分的混和次序，增加了 IMF 生产过程的复杂性，上述各因素也会对这些产品的微生物学特性起间接或直接的影响。

在 IMF 生产中经常采用的改变水分活性的技术有下列几种[20]：

①湿浸（Moist infusion）：固体食品片在一合适的溶液中浸泡或预煮，以达到最终要求的产品水分含量（解吸作用）；

②干浸（Dry infusion）：固体食品片首先被脱水，然后浸入含特定的渗透剂的溶液中（吸附作用）；

③成分混合（Component blending）：所有 IMF 成分经称重、混合、蒸煮、挤压或以另外方式结合得到具有所要求 Aw 值的终产品；

④透渗干燥（Osmotic drying）：将食品浸渍于比其水分活度低的溶液中进行脱水。当使用盐和糖时，同时产生两种逆流式流动：溶质从溶液扩散至食品中，水从食品中扩散

至溶液中。

表 17.4 所列的是一些由湿浸方法生产的军用食品。1cm 厚的原料以 95～100 C 预煮后平衡饱和，并在冰箱中维持一夜时间。不经预煮，通过延长在冰箱中的时间也可起平衡饱和作用[6]。用湿浸方法还开发生产了油炸鲶鱼半干食品，其原料每块重约 2g[9]。宠物食品通常由成分混合法生产。表 17.5 给出的是一种这类产品的总成分表。这类食物通常按下述方法生产：肉及肉制品先磨碎，再与液体成分混合。得到的软膏经蒸煮或热处理，再与干成分（盐、糖、干固形物等）混合。得到的半成品中，在挤压和包装前再进行一次蒸煮或热处理。挤出的食物可制成馅饼形状或以松散形式进行包装。一种被称为 Hennican 的典型 IMF 产品的成分列于表 17.6。根据 Acott 和 Labuza[1]所述，这是一种干肉饼的改型产品，一种在印度流行的冬季贮存的产品，由牛肉和浆果组成。以鸡肉为基本材料的 IMF 被称为 Hennican。通常调节混合的成分可以改变这类产品的水分含量和 A_w 值。

表 17.4　　代表性半干食品的生产（饱和平衡法）

原材料	H_2O 含量/%	加工工艺	平衡后产品		比例＝原重/溶液重	溶液中各成分含量/%					
			H_2O 含量/%	A_w		甘油	H_2O	食盐	蔗糖	山梨酸钾	苯甲酸钠
金枪鱼，罐装小块，1cm 厚	60.0	冷浸	38.8	0.81	0.59	53.6	38.6	7.1	—	0.7	—
熟的胡萝卜丁，0.9cm	88.2	95～98℃蒸煮、冷藏	51.5	0.81	0.48	59.2	34.7	5.5	—	0.6	—
通心粉，时状，熟的，脱水	63.0	95～98℃蒸煮、冷藏	16.1	0.83	0.43	42.7	48.8	8.0	—	0.5	—
菠萝，罐装，厚块	73.0	冷浸	13.0	0.85	0.46	55.0	21.5		23.0	0.5	
猪排，牛的，1cm 厚	70.0	95～98 C 蒸煮、冷藏	42.5	0.81	0.73	45.6	43.2	10.5	—	0.7	—
芹菜，0.6cm 长，热烫，横切	94.7	冷浸	39.6	0.83	0.52	68.4	25.2	5.9	—	0.5	—
牛里脊肉，1cm 厚	70.8	95～98 C 蒸煮、冷藏		0.86	2.35	87.9	—	10.1	—	—	2.0

在宠物食物配方中常用的保湿剂是丙二醇、多元醇（例如山梨醇）、聚乙二醇、甘油、糖（蔗糖、果糖、葡萄糖和玉米糖浆）和盐（NaCl、KCl 等）。常用的抑菌剂是丙二醇、山梨酸钾、苯甲酸钠及其它。这类产品的 pH 应低于 5.4 和高于 7.0。

17.4.2 IMF 的微生物特性

通常，在 IMF 产品的 A_w 范围内革兰氏阴性菌是不可能增殖的。除了一些球菌、生

芽孢菌和乳酸菌外，革兰氏阳性菌也如此。除了低 A_w 值对微生物的抑制作用外，在 IMF 生产过程中，起协同抑菌作用的还有：pH、Eh、加入的防腐剂（包括一些保湿剂）、菌群的竞争性生存作用、通常较低的贮存温度以及巴氏杀菌或其它加热处理等。

表 17.5　　半干狗食的一般组成

成分	含量/%	成分	含量/%
肉类副产品	32.0	山梨醇	2.0
酱汁蛋身肉（soyflakas）	33.0	动物脂肪	1.0
糖	22.0	乳化剂	1.0
脱脂乳粉	2.5	盐	0.6
钙和磷	3.3	山梨酸钾	0.3
丙二醇	2.0	无机盐、维生素、色素	0.3

表 17.6　　Hennican 的成分

成分	含量/（以湿基计%）	成分	含量/（以湿基计%）
葡萄干	30	脱脂乳	11
水	23	花生油	4
花生	15	蜂蜜	2
鸡肉（冷冻干燥）	15		

注：水分含量为 41g 水/100g 固形物，A_w=0.85。

图 17.1 反映的是加入甘油的 IM 猪肉块在 25℃贮存时，金黄色葡萄球菌 S-6 的死亡率情况。用解吸法生产的 IM 猪肉块，在 A_w 为 0.88 时，该菌菌数在大约 15d 内基本保持稳定，然后稍有增加；而用吸附法生产的 IMF 在同样 A_w 值下，该菌在前三星期消亡缓慢，之后快速消亡。

在 A_w 低于 0.88 时，微生物呈消亡趋势，并且 A_w 为 0.73 时的消亡速度远高于 A_w 高于 0.73 时所对应的消亡速度[27]。Haas 等人[15]也报道了类似的结果，他们在肉-糖体系中接入 10^5 浓度的葡萄球菌，其 A_w 值在约 0.80 时，经过 6d 后菌数降为 3×10^3，1 个月后降至 3×10^2。虽然金黄色葡萄球菌在 A_w 为 0.83 时可能生长，但在 A_w 低于 0.86 时不会产生肠毒素[34]。在低 A_w 值下，肠毒素 A 似乎比肠毒素 B 更易产生[35]。

以典型的 IM Hennican（pH5.6，A_w0.91）为研究对象，Boylan 等人[5]指出：这一 IM 体系对金黄色葡萄球菌 F265 的有效抑制作用是 pH 和 A_w 共同作用的结果。就抑菌效果而言，吸附体系比解吸体系更有效，Labuza 等人[22]发现：报道的菌生长的最小 A_w 值适用于用解吸作用生产的 IMF 体系，但在用吸附方法生产的食品中，菌生长的最小 A_w 要高得多。例：在利用吸附方法生产的食品体系中，金黄色葡萄球菌在 A_w 约为 0.9 时被抑制，而在解吸方法生产的食品体系中，要求的 A_w 值为 0.75～0.84。对霉菌、酵母和假单

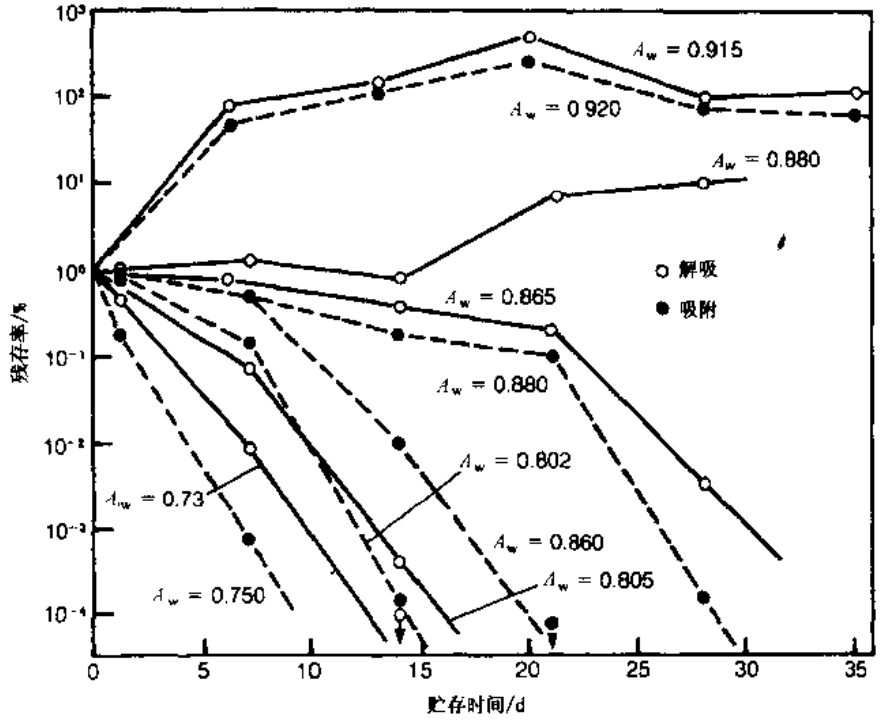


图 17.1 金黄色葡萄球菌在 IMF 体系中的存活情况（猪肉＋甘油，25℃）

孢菌也有此效应。

关于 IMF 体系对细菌热致死的影响作用，当 A_w 降低时菌的耐热性增加，增加的程度取决于控制 A_w 值的各种化合物（见表 16.2）。通过对 A_w 约为 0.8 的 IM 体系在 50～60℃巴氏杀菌温度下沙门氏菌和葡萄球菌的致死速率的研究发现：微生物细胞的死亡符合一级反应动力学过程[18]。这些研究者同时证实了许多其它的结论：在半湿范围中营养细胞的热致死率是最低的，尤其在使用固体介质时。不同 A_w 下桑夫顿堡格沙门氏菌 775W 其热致死 D 值可见表 16.2。

就 IMF 体系中的霉菌而言：如果 A_w 降至 0.7 左右，产品的稳定性可能会相当好，但此时产品可能已制成干品了。在 A_w 为 0.8 左右时大量霉菌可以生长，由此限制了 IM 宠物食品的货架期的提高。不同 IM 参数对霉菌抑制作用的相互影响已由 Acott 等人[21]进行了研究。他们用 7 种化学抑制剂单独或结合使用进行抑制黑曲霉和灰绿曲霉试验，聚乙二醇被证实是惟一一种单独使用有效的化学抑制剂。在 A_w 为 0.88 时，被试的抑制剂中没有一种有单独抑菌效果。但在结合使用时，产品达到了要求的货架稳定期。所有抑菌剂在 pH5.4，A_w0.85 时比 pH6.3 时更有效。不加抑菌剂的 A_w 为 0.85 的配方食品中，2 周后有 2 种真菌生长繁殖，而加入山梨酸钾和丙酸钙后，25 周后才有真菌生长繁殖（表 17.7）。通过这 2 种真菌抑制剂可以抑制表皮葡萄球菌的生长，且 A_w 为 0.85 时的抑制效果要比 A_w 为 0.88 时的好。这或许是 IMF 体系中 pH、A_w 和其它生长参数对微生物综合抑制效果的一个例子。

表 17.7　　抑制剂对接种于狗食中的微生物生长时间的影响（pH5.4）

抑制剂	贮藏条件	
	A_w=0.85　贮藏 9 个月	A_w=0.88　贮藏 6 个月
不加抑制剂	黑曲霉：2 周 灰绿曲霉：1 周 表皮葡萄球菌：2 周	黑曲霉：1 周 灰绿曲霉：1 周 表皮葡萄球菌：1.2 周
山梨酸钾（0.3%）	无霉菌 表皮葡萄球菌：25 周	黑曲霉：5 周 表皮葡萄球菌：3.5 周
丙酸钙（0.3%）	黑曲霉：25 周 灰绿曲霉：25 周 表皮葡萄球菌：3.5 周	绿曲霉：2 周 表皮葡萄球菌：1.5 周

注：霉菌　　出现可见菌迹象；细菌 -- 增加 2 个对数级。

17.4.3　IMF 的贮存稳定性

干制食品中发生的不利化学变化也同样发生在 IM 食品中。IMF 生产中控制的 A_w 值和水分含量通常又是最易发生脂肪氧化和美拉德反应的条件。美拉德反应在 A_w0.4～0.5 范围内具最高的反应速率，在使用甘油作为保湿剂的情况下尤为如此[36]。

为防止霉变和保证货架期内产品的质量稳定，必须将 IMF 贮存于适宜的湿度环境中。就这点而言，测定平衡相对湿度（ERH）是重要的。ERH 表示的是存在于食品产品中的可解吸的水分，并定义为：

$$\mathrm{ERH} = (p_{equ}/p_{sat}), T, p = 0.1\mathrm{MPa}$$

这里 p_{equ}是指：在总气压为 0.1MPa 和温度 T 下，样品吸附平衡时的水蒸气分压；p_{sat}：在总气压为 0.1MPa 和温度 T 下，空气中水的饱和蒸汽分压[16]。食品在潮湿空气中进行水分的交换，直至其平衡水蒸气分压达到该温度下潮湿空气中水的分压，所以 ERH 值是食品吸收水分还是解吸水分的直接尺度（反映）。如果用于包装食品的材料是水不渗性的，包装内食品周围空气的相对湿度是由产品的 ERH 决定的，而后又依次受存在的可溶固体的性质、固体和水分之间的比值等因素控制[30]。在低 ERH 条件下，传统的和新型的 IMF 产品都有较长的货架期稳定性。

除了包装对 ERH 有直接影响外，气不透性包装也影响包装食品的平衡湿度（EH），由此影响对需氧微生物生长的抑制作用。

17.5　IMF 和玻璃态转变

一些学者对使用 A_w 值来衡量 IMF 体系中微生物活性这一问题提出了质疑，他们认为 A_w 值（water dynamics）也许是这一体系中预测微生物活性的更好方法。D_w 反映的是食品构成中对水分含量和温度变化敏感的无定形基质构成情况。这种基质（matrix）可以

以非常黏的玻璃态或以与液体非常相似的“胶质态”无定形结构的形式存在。因此玻璃态是指液态无定形基质和胶质态（rubbery）系统增加的黏度，由此导致抑制或减缓流动。在玻璃态，成分的结晶作用可以被制止。在一个特定的温度 Tg 下可以发生玻璃态-胶质态的转化，Tg 随着水分的增加而下降。Tg 已被提议作为 IMF 体系货架期稳定性预测的参数，且有人认为其效果比 A_w 值法好[23,32]。

关于上述概念在 IMF 体系中应用的可行性和有效性还有待于在更广泛的范围内得到证实。一个研究小组已对此进行了试验，并认为在预测食品体系微生物活性方面，该法未必比 A_w 法好[8]。

参 考 文 献

[1] Acott, K. M., and T. P. Labuza. 1975. Inhibition of *Aspergillus niger* in an intermediate moisture food system. *J. Food Sci.* 10: 137～139.

[2] Acott, K. M., A. E. Sloan, and T. P. Labuza. 1976. Evaluation of antimicrobial agents in a microbial challenge study for an intermediate moisture dog food. *J. Food Sci.* 41: 541～516.

[3] Bone, D. 1973. Water activity in intermediate moisture foods. *Food Technol.* 27 (4): 71～76.

[4] Bone, D. P. 1969. Water activity Its chemistry and applications. *Food Prod. Dev.* 3 (5): 81～94.

[5] Boylan, S. L., K. A. Acott, and T. P. Labuza. 1976. *Staphylococcus aureus* challenge study in an intermediate moisture food. *J. Food Sci.* 41: 918～921.

[6] Brockmann, M. C. 1970. Development of intermediate moisture foods for military use. *Food Technol.* 24: 896～900.

[7] Burke, R. F., and R. V. Decareau. 1964. Recent advances in the freeze-drying of food products. *Adv. Food Res.* 13: 1～88

[8] Chirife, J., and M. D. P. Buera. 1994. Water activity, glass transition and microbial stability in concentrated/semimoist food systems. *J. Food Sci.* 59: 921～927.

[9] Collins, J. L., and A. K. Yu. 1975. Stability and acceptance of intermediate moisture, deepfried catfish. *J. Food Sci.* 40: 858～863.

[10] Davis, R. J. 1963. Viability and behavior of lyophilized cultures after storage for twentyone years. *J. Bacteriol.* 85: 486～487.

[11] Desrosier, N. W. 1963. *The Technology of Food Preservation*. New York: Van Nostrand Reinhold.

[12] Fennema, O., and W. D. Powrie. 1964. Fundamentals of low-temperature food preservation. *Adv. Food Res.* 13: 219～347.

[13] Fry, R. M., and R. I. N. Greaves. 1951. The survival of bacteria during and after drying. *J. Hyg.* 49: 220～246.

[14] Gooding, E. G. B. 1962. The storage behaviour of dehydrated foods. In *Recent Advances in Food Science*, ed. J. Hawthorn and J. M. Leitch, vol. 2, 22～38. London: Butterworths.

[15] Haas, G. J., D. Bennett, E. B. Herman, and D. Collette. 1975. Microbial stability of intermediate moisture foods. *Food Prod. Dev.* 9 (4): 86～94.

[16] Hardman, T. M. 1976. Measurement of water activity. Critical appraisal of methods. In *Intermediate Moisture Foods*, ed. R. Davies, G. G. Birch, and K. J. Parker, 75～88. London: Applied

Science.

[17] Harper, J. C., and A. L. Tappel. 1957. Freeze-drying of food products. *Adv. Food Res.* 7: 171～234.

[18] Hsieh, F. -H., K. Acott, and T. P. Labuza. 1976. Death kinetics of pathogens in a pasta product. *J. Food Sci.* 41: 516～519.

[19] Kaplow, M. 1970. Commercial development of intermediate moisture foods. *Food Technol.* 24: 889～893.

[20] Karel, M. 1976. Technology and application of new intermediate moisture foods. In *Intermediate Moisture Foods*, ed. R. Davies, G. G. Birch, and K. J. Parker, 4～31. London: Applied Science.

[21] Labuza, T. P. 1968. Sorption phenomena in foods. *Food Technol.* 22: 263～272.

[22] Labuza, T. P., S. Cassil, and A. J. Sinskey. 1972. Stability of intermediate moisture foods 2. Microbiology. *J. Food Sci.* 37: 160～162.

[23] May, K. N., and L. E. Kelly. 1965. Fate of bacteria in chicken meat during freeze-dehydration, rehydration, and storage. *Appl. Microbiol.* 13: 340～344.

[24] Meryman, H. T. 1966. Freeze-drying. In *Cryobiology*, ed. H. T. Meryman, ch. 13. New York: Academic Press.

[25] Mossel, D. A. A., and M. Ingram. 1955. The physiology of the microbial spoilage of foods. *J. Appl. Bacteriol.* 18: 232～268.

[26] Pitt, J. I., and J. H. B. Christian. 1968. Water relations of xerophilic fungi isolated form prunes. *Appl. Microbiol.* 16: 1853～1858.

[27] Plitman, M., Y. Park, R. Gomez, and A. J. Sinskey. 1973. Viability of *Staphylococcus aureus* in intermediate moisture meats. *J. Food Sci.* 38: 1004～1008.

[28] Robson, J. N. 1976. Some introductory thoughts on intermediate moisture foods. In *Intermediate Moisture Foods*, ed. R. Davies, G. G. Birch, and K. J. Parker, 32～42. London: Applied Science.

[29] Scott, W. J. 1957. Water relations of food spoilage microorganisms. *Adv. Food Res.* 1: 83～127.

[30] Seiler, D. A. L. 1976. The stability of intermediate moisture foods with respect to mould growth. In *Intermediate Moisture Foods*, ed. R. Davies, G. G. Birch, and K. J. Parker, 166～181. London: Applied Science.

[31] Slade, L., and H. Levine. 1991. Beyond water activity: Recent advances based on an alternative approach to the assessment of food quality and safety. *CRC Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 30: 115～360.

[32] Slade, L., and H. Levine. 1987. Structural stability of intermediate moisture foods A new under standing. In *Food Structure—Its Creation and Evaluation*, eds. J. R. Mitchell and J. M. V. Blanshard, 115～147. London: Butterworths.

[33] Sloan, A. E., P. T. Waletzko, and T. P. Labuza. 1976. Effect of order-of-mixing on a_w-lowering ability of food humectants. *J. Food Sci.* 41: 536～540.

[34] Tatini, S. R. 1973. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *J. Milk Food Technol.* 36: 559～563.

[35] Troller, J. A. 1972. Fffect of water activity on enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 24: 440～443.

[36] Troller, J. A., and J. H. B. Christian. 1978. *Water Activity and Food*. New York: Academic Press.

第六部分　食品安全的微生物指标、质量控制原理和微生物标准

在第六部分18中将介绍以微生物以及微生物的产物作为食品质量的标准情况，尤其是将大肠杆菌和肠球菌作为食品安全性指示剂。在第六部分19中介绍控制食品病原菌量好的方法：危险分析关键点控制体系（HACCP）。这一部分还包括采样方案和微生物标准的事例。食品质量控制整个领域已经得到全面的关注，相关的许多思路和方法还可以从以下这些资料中获得：

Shapton，D. A 和 N. F. Shapton 的“食品加工安全性原理与实践”（Stoneham，MA：Butterworth-Heiemann，1991 包括 HACCP 和微生物标准。

Bills，D. D.，Shain-dow Kung 和 R. Quatrano 的“生物技术与食品质量”（Stoneham，MA：Batterworth-Heiemann，1989），包括食品质量的评价和基因工程产品的质量。

Stevenson，K. E. 和 D. T. Bernard 1995。建立危险分析关键点控制体系　　HACCP（操作手册），介绍建立和检测危险分析关键点控制体系（HACCP）的每一步骤。

Troller. J. A 食品卫生（New York：Academic Press，1983），包括控制微生物的实用方法。

18. 食品微生物质量和安全性指标

微生物指标可以反映食品的微生物质量，这些质量同产品有效期或由食品引起的传染病致病菌等的安全性有关。这些指标常用于评价加工食品的环境的卫生情况，本部分主要讨论这些内容：以下方面的内容中有人们会用到的这些指标。

18.1　产品质量指标

产品的微生物质量或有效期的指标为微生物或它们的代谢产物，在某种程度上微生物在给定食物中的存在情况可以用来评价微生物质量或用来预测产品有效期。在这种情况下，微生物指标应满足以下标准：

①全部食物中可检测存在的微生物，并可通过检测的微生物评价食物的质量（或缺陷）。

②微生物的生长和数量应与产品质量有一种直接的互为对立的关系。

③易于检测和计数并可从其他微生物中明确地区分开所要检测的微生物。

④在短时间内最好在一个工作日内可以计数。

⑤微生物生长不应受食品微生物群落中其他成分的负面影响。

通常，产品质量的最可靠指标为对产品专一性的微生物：一些食品和相应的微生物指标列于表 18.1 中。这些产品中含有限定的微生物，并且腐败为某一微生物生长的典型结果。当单一微生物引起腐败时，可利用选择培养或通过用适当的选择培养基阻碍生长的方法来监控微生物数量。这些微生物的数量可影响表 18.1 中提到的全部产品的微生物质量，并且通过控制菌数可以延长产品有效期。实际上，评价产品质量的微生物为腐败微生物，其数量增加会使产品质量下降。

表 18.1　　与产品质量密切相关的微生物

微生物	产品	微生物	产品
醋酸杆菌	鲜苹果汁	乳球菌	生牛乳（冰箱保存）
杆菌	面包面团	肠膜明串珠菌	糖（精制过程中）
丝衣霉菌	罐装水果	嗜啤酒梳状菌	啤酒
梭状芽孢杆菌	硬干酪	腐败极毛杆菌	奶油
平酸菌芽孢	罐装蔬菜	酵母	水果汁浓缩物
乳酸菌	啤酒、葡萄酒	结合酵母	蛋黄酱、沙拉调味汁

在一些产品中，代谢产物可以用来评价和预测微生物质量：一些实例列于表 18.2 中。二胺（戊二胺和丁二胺）、组胺和聚酰胺对于一些产品质量有重要意义（在第二部分 4 中有更深入的讨论）。丁二酮可从相反的方面预测冷冻橘汁浓缩物的质量，它在 0.8μL/L 或更高水平下可产生一种酪乳的香味[46]。Murdock[45]提出了检测产品质量的一种 30min 方法，并建议把乙醇作为一种罐装鲑鱼质量的指标，其浓度为 25-74μL/L 时会产生臭气，高于 75μL/L 时则意味着腐败[24]。在保存于 5℃的鱼抽提物中，在几种醇中以乙醇最常见，241 个腐鱼中有 227 个产生乙醇[3]。在腐败罐装蔬菜中乳酸为最常见的有机酸，并且检测已应用一种快速(2h)硅胶平板方法[1]。许多研究者把在腐鱼中从氮氧化三甲胺中制取三甲胺(TMA)作为一种质量或腐败指标。用于测定总挥发性物质的各种方法也已作为鱼肉质量的指标，包括总挥发碱(TVB) – 氨、二甲基胺和 TMA —— 和总挥发氮(TVN)——包括 TVB 和其他含 N 化合物，通过蒸汽蒸馏鱼产品可释放出这些挥发性物质。

表 18.2　　与食品质量相关的微生物代谢产物

代谢物	应用的食品产品	代谢物	应用的食品产品
戊二胺和丁二胺	真空包装牛肉	乳酸	罐装蔬菜
丁二酮	冷冻浓缩汁	三甲胺	鱼
乙醇	苹果汁、水产品	总挥发碱、总挥发氮	海产品
组胺	罐装金枪鱼	挥发性脂肪酸	黄油、奶油

总活菌数方法已用于评价产品质量。它们作为给定产品的微生物指标比预测产品的

有效期更有价值，因为很难确定最终腐败物中的菌数。

总之，评价产品质量的微生物指标可以用于食品，对于这些产品可通过过程参数和条件限制微生物生长，在这里食品的腐败与特定微生物的数量有关。当某代谢产物的存在和数量显著影响产品质量时，它们也可以作为评价质量的指标。在这方面总活菌数通常不很可靠，但它们比直接的显微镜数菌法要好一些。

18.2 食品安全性指标

微生物指标更多用于评价食品安全性和环境卫生情况而非产品质量。食品安全性指标应满足以下某些重要指标：

①易于快速检测；

②易于从其他食品微生物中区分开来；

③有可检测到的致病菌的相关阶段；

④与相关致病菌同时存在；

⑤是一种其数量应与相关致病菌有关的微生物；

⑥具有与致病菌等同的生长要求和生长速率；

⑦具有类似于致病菌的死亡率，并且最好比相关致病菌更加稳定；

⑧除了可能含有的某一最小数量外，在对于致病菌开放的食物中数量较少。

这些标准应用于许多食品。在这些食品中可能存在由食物引起的传染性致病菌，而不论它们在食物中的来源如何。然而，在过去使用安全性指标的过程中，推测相关致病菌来源于内部，其原因为直接或间接的粪便污染。因此，过去使用这些卫生指标来考察水的粪便污染情况和内部致病菌存在的可能性。粪便污染指标首先指大肠杆菌。当粪便污染的指标应用于食品安全性时，需另外增加一些附加标准，而由 Buttiaux 和 Mossel[8] 所建议的那些标准仍然有效：

①所选择的细菌理想上应具有专一性，只在内部环境中出现；

②它们在粪便中应有很大数量从而需进行高倍稀释；

③它们对于外部环境应有较高的耐受性，从而可以评价它们对外界环境的污染；

④当它们数量较少时，应可以进行相对容易和可靠的检测。

在将大肠杆菌作为水的粪便污染情况的指标之后，也建议将其他微生物作为污染指标。现在，这些微生物的大部分已用作食品污染指标。

18.2.1 大肠菌群

在 1885 年试图分离霍乱的病源学因素时，Escherich[15] 分离并研究了现在称为大肠杆菌的微生物。最初称之为大肠杆菌群落是因为它存在于被检查的每个病人的粪便中。Schardinger[59] 首先建议使用这种微生物作为粪便污染的一个指标，因为它比其他的由水引起的传染性致病菌更容易分离和鉴定。1895 年 T. Smith[64] 提出了用这种微生物作为饮用水可饮性检测方法的试验。这标志着大肠菌群作为水的致病菌指标的开始，其实际应用已扩展到食品。

18.2.1.1 菌株

在实际观察中，大肠菌群为革兰氏阴性无芽孢杆菌，它在48h内发酵乳糖并在远藤氏琼脂培养基[4]上形成带有金属光泽的黑色菌落。从广义上，大肠菌群由4种家族肠道菌所代表：柠檬酸菌、肠道细菌、埃希氏菌和克雷伯氏菌。欣氏亚利桑纳菌和蜂房哈夫尼菌有时发酵乳糖，但通常不是48h内，而一些成团泛菌在48h内对乳糖呈阳性。

由于大肠杆菌比其他菌种（特别是产气肠杆菌）更能显示粪便污染情况，因此人们希望确定大肠杆菌在某一大肠菌群中的存在情况。IMViC是所使用的经典方法，这里I=产生吲哚，M=甲基红反应，V=Voges-Proskauer反应（产生3-羟基丁酮·[2]），和C=柠檬酸盐的利用。通过这种方法，两种微生物具有以下结果：

	I	M	V	C
大肠杆菌	+	+	−	−
产气肠杆菌	−	−	+	+

IMViC反应++−−指明大肠杆菌I型；大肠杆菌II型为−+−−。NR反应最适合用于大肠杆菌。柠檬酸菌已被认为是中间大肠菌群，并已知由于一些菌株的影响而使其延迟乳糖发酵。全部菌株为MR+和VP−。多数菌株为柠檬酸盐+，而对于吲哚的产生却有不同情况，关于IMViC反应，克雷伯氏菌分离物情况有较大的不同，尽管肺炎克雷伯氏菌通常为MR−，NP+和C+，但在MR和I反应中会出现不同情况。用来区分大肠杆菌和其他大肠菌群的荧光基质方法在第四部分11中已有论述。

在44℃和46℃之间，在EC肉汤中产生酸和气，会限制粪便大肠菌群的生长，其培养温度通常为44.5℃或45.5℃（1942年Perry和Hajna[52]）提出了EC肉汤用于大肠杆菌的内容）。用于粪便大肠菌群的试验必然可用于大肠杆菌I型，但一些柠檬酸菌和克雷伯氏菌菌株也适合这个限定的要求。值得注意的例外情况为EHEC菌株（见下文），在44.5℃下它在标准EC培养基中不生长，但当培养基中胆盐含量从0.15%减至0.112%时它将生长[67]。检测和区分大肠菌群、粪便大肠菌群和大肠杆菌的示意图见图18.1。

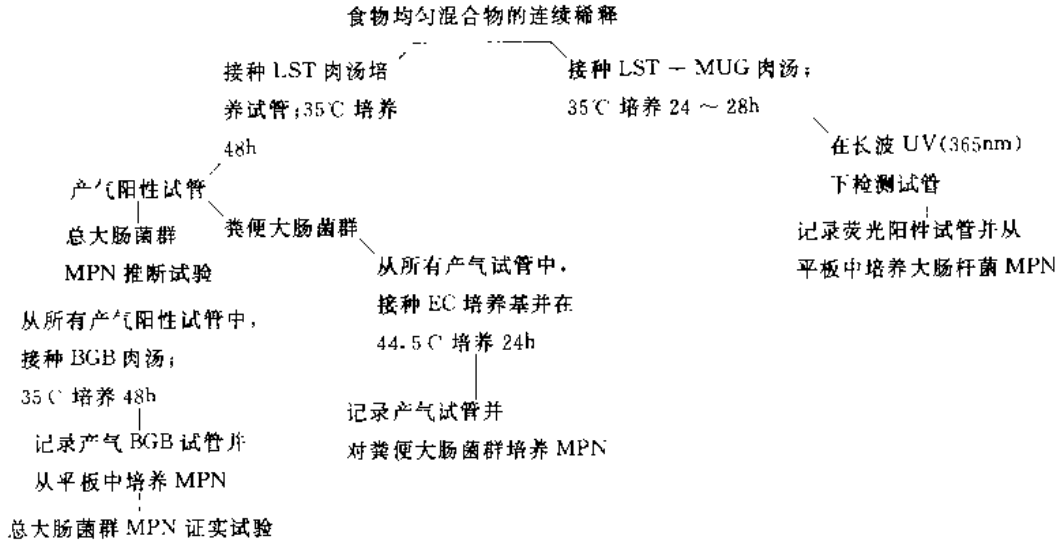


图18.1 用于总大肠菌群、粪便大肠菌群和大肠杆菌的最大可能数量方法的概括[2b]

在第七部分24中讨论了引起胃肠炎和相关综合征状的大肠杆菌。

18.2.1.2 生长

正如许多其他非致病革兰氏阴性细菌，在许多培养基和许多食物中大肠菌群生长很好。它们能在最低（－2℃）和最高（50℃）温度下生长。在食物中，尽管一些研究者已报道了大肠菌群在3～6℃的生长情况，但它在5℃生长较差或很缓慢。已有报道大肠菌群在4.4～9.0的pH范围内生长。大肠杆菌能在基本培养基中生长，这种培养基只含有如葡萄糖的一种有机碳源和如$(NH_4)_2SO_4$的氮源及其他无机盐。在营养琼脂中大肠菌群生长较好并于37℃在12～16h内形成可见的菌落，可以料想在适当条件下它们能在许多食物中生长。

大肠菌群能在胆盐中生长，而胆盐抑制革兰氏阳性细菌的生长。利用这种特性可从各种不同来源的样品中进行选择性分离。与许多其他细菌不同，大肠菌群能发酵乳糖，同时产生气体，而利用这种特性可以作出一些推测。大肠菌群通常很容易进行培养和区分，这使它们可以作为理想的指标，除非由于非典型菌株的出现使它们的鉴定变得复杂。然而，异常乳糖发酵似乎可以说明卫生情况有问题[19]。

作为水的粪便污染指标，大肠杆菌引人注意的一个特性在于其存活生长的阶段。它通常在肠道致病菌生长得更加旺盛的同时而渐渐死亡，但一些报道指出有些致病菌在水中的耐受性更强。然而，这些致病菌的耐受性却不如肠内病毒强（见下文）。Buttiaux和Mossel[8]得出结论，在食品冷冻，冷藏保存，或照射而使大肠杆菌死亡之后，各种致病菌仍可能存活。类似的，在杀灭大肠杆菌之后，在处理过的水中仍可能有致病菌存活。只有在酸性食物中，由于大肠杆菌对低pH具有相对耐受性而作为一种微生物指标具有特殊意义[8]。

18.2.1.3 检测和菌落计数

许多检测和计数大肠杆菌和大肠菌群的方法列于表18.3（关于这些方法的详细内容见第四部分11）。许多方法反映出由于大肠菌群作为食品安全性指标具有更加快速、准确和更有价值的特点，而使人们对此产生了强烈的兴趣。虽然直接计数和最大可能数量（MPN）方法要在24～48h后才能取得结果，但它们作为可参考的方法仍很有意义。

表18.3　　检测或计数大肠菌群和大肠杆菌的一些方法

方法	得出结果的时间	敏感度	主要用途	备注
直接计数				
VRBA平板培养				
推测结果	18～24h	～10/g	总大肠菌群	
证实结果	24～48h	～10/g	总大肠菌群	
安德逊和拜氏磷酸盐处理	24h	～10/g	EC类型1	
英式转管培养	24h	1/g	EC	44.5℃培养
十培养平板				
VRB培养基	24h	～10/g	总大肠菌群	
VRB培养基	24h	～10/g	粪便	44.5℃培养
EC菌数	24h	～10/g	EC	使用MUG底物
肉汤培养方法				
典型MPN，推断	24～48h	<1/100mL	总大肠菌群	LST肉汤

续表

方法	得出结果的时间	敏感度	主要用途	备注
典型 MPN，证实	24h		总大肠菌群	LST 到 BGLB 肉汤
典型 MPN，用于粪便	24h	<1/100mL	粪便	LST 到 EC 培养基
膜滤·其他过滤方法				
标准膜滤方法	24h	<1/g	总大肠菌群	LES 远藤氏琼脂培养基
M FC 方法	24h	<1/g	粪便	M-FC 肉汤；44.5℃
M 7hFC 方法	7h	<1/g	粪便	M-7hFC 琼脂；41.5℃
大肠杆菌菌数标准样	24	≥10/g	粪便	
HGMF 方法	24h	1/g	大肠菌群	
HGMF-FLA	24h	10/g	ECO157：H7	HC 琼脂培养基
产荧光底物方法				
LST－MUG	20h	1 个细胞	EC	
X-GLUC 平板	24h	~10/g	EC	35℃培养
MUGal 平板	6h	1/100mL	EC	
限制底物方法				
存在缺少（P A）	24h	1/100mL	EC，大肠菌群	
阻碍	6.5h	$\sim10^3$/g	大肠菌群	特殊培养基
获得酶化验（ECA）	24h	<1/g	EC	ECA 来自 LST 管
辐射测定化验	6h	1~10/g	大肠菌群	需辐射标记
DNA 探针	3～4d	<2/g	ECO157：H7	菌落杂交和菌斑化验
DNA 放大作用（PCR）	8h，12h	20 个细胞	EC	检测 DNA 序列
谷氨酸脱羧酶化验	10h	1 个细胞	EC	
乙醇化验	9h	~10/mL	大肠菌群	气相色谱
噬菌体检测	4～6h	~5/100mL	EC	噬菌斑化验

注：BGLB－亮绿乳糖胆汁；EC＝大肠杆菌；ELA－标记酶抗体；HC－出血性结肠炎；HGMF＝硫水栅极膜过滤；LST－月桂硫酸盐胰蛋白胨；M FC＝微粒粪便菌数；MPN＝最大可能数量；MUG－4-methylumbelliferylβ-D-葡糖苷酸；MUGal＝4 methylumbelliferyl-β-D-半乳糖苷；VRB－紫红胆汁；X GLUC＝4-溴-4-氯-3-吲哚-β-D-葡糖苷酸（详见第四部分 10、11）。

18.2.1.4 分布

大肠杆菌的主要生长环境是许多热血动物的肠道，但它有时在猪肠道中较少。产气肠杆菌的主要生长环境为植物而有时为肠道。在空气和尘土及许多食物上和食物中不难证实大肠菌群的存在。但问题不只是大肠菌群的存在情况而是它们的相对数量。例如，许多商品蔬菜中藏有少量乳糖发酵，革兰氏阴性，杆状大肠菌群类型，但如果适当采收和处理这些产品，菌数将会更低，从而对公众健康没有实际影响。

18.2.1.5 大肠菌群的规定和标准

虽然人们不希望在食物中存在大量大肠菌群和大肠杆菌，但实际上在新鲜和冷冻食物中并不可能除去所有病菌。有关菌数的基本问题如下：

①通过利用危害分析关键控制点（HACCP）体系在适当条件下收集、处理、保存和运输食品，大肠菌群的最低可能和可行的数量为多少？

②大肠菌群或大肠杆菌在什么数量水平上意味着产品已不安全？

对于水和牛乳制品，有关大肠菌群数量的安全性规定已建立很长时间。一些管理机

关提出的水、牛乳制品和其他食品的大肠菌群和大肠杆菌指标和规定如下：

①对于 A 级巴氏灭菌牛乳和牛乳制品，包括发酵制品，不高于 10/mL；

②特级生牛乳不高于 10/mL，特级巴氏灭菌牛乳不高于 1/mL；

③预煮和局部蒸煮的冷冻食品不高于 10/mL；

④蟹肉不高于 100/mL；

⑤充满奶油的制品不高于 100/mL。

敏感食物中少量大肠菌群的数量范围从 1 到不高于 100/g 或 100mL。这些标准反映了可行性和安全性参数。

对于某些制品，国际食品微生物规范委员会 [ICMSF[25]] 提出的大肠菌群标准列在表 18.4 中。这里对于这些产品所做的评价不应该离开提出的整体标准而单独使用。这里所列出的内容只表明涉及的产品的大肠菌群或大肠杆菌的可接受和不可接受范围。对于最初 4 种产品，这里的建议意味着许多样品中的 5 个副样品中，有 1 个或 2 个可能含有高达 10^3 的大肠菌群，而这对人类的消费利用仍是安全的。

表 18.4　　建议的大肠菌群/大肠杆菌标准

指标	产品	计划水平	n	c	m	M
1. 大肠菌群	乳粉	3	5	1	10	10^2
2. 大肠菌群	巴氏消毒的液体，冷冻和蛋粉制品	3	5	2	10	10^3
3. 大肠菌群	婴儿、儿童和成人营养食品；外裹或夹心，干燥的保存稳定的饼干	3	5	2	10	10^2
4. 大肠菌群	需要复水的干燥速溶制品	3	5	1	10	10^2
5. 大肠菌群	在使用前要加热至沸的干制品	3	5	3	10	10^2
6. 大肠菌群	熟的即食蟹肉	3	5	2	500	5000
7. 大肠菌群	熟的即食小虾	3	5	2	100	10^3
8. 大肠杆菌	新鲜、冷冻、冷熏的鱼；冷冻的生甲壳动物	3	5	3	11	500
9. 大肠杆菌	预煮的拌粉鱼；冷冻的熟甲壳动物	3	5	2	11	500
10. 大肠杆菌	熟的、冷却的、冷冻的蟹肉	3	5	1	11	500
11. 大肠杆菌	冷冻蔬菜/水果，pH>4.5；脱水蔬菜	3	5	2	10^2	10^3
12. 大肠杆菌	新鲜/冷冻双壳类软体动物	2	5	0	16	--
13. 大肠杆菌	瓶装水	2	5	0	0	—

注：6 和 7 项为 1990 年 1 月国家食品微生物标准顾问委员会，USDA/FDA 的建议，提到的标准用于整个加工过程。其他条款出自 ICMSF[25]

18.2.1.6　安全使用食品的某些限制

虽然大肠菌群指标用于食品已有很多年，但这些指标用于某些食品仍有一些限制。1920 年美国公众健康协会的一个委员会提出利用大肠菌群[37]来作为评价巴氏灭菌是否充分的方法，并且于 1930 年前后在乳品工业很好地确立了这种方法[51]。用于牛乳生产的大肠菌群试验不是为了表明粪便污染情况而是反映整个乳场和工厂的卫生情况[57]。对于冷冻的热处理蔬菜，大肠菌群数量不能说明加工环境的卫生情况，因为其中的一些菌株，特别是肠道菌类型同植物有广泛联系[65]。然而，大肠杆菌的存在可能说明在加工过程中

有问题。对于禽肉制品，大肠菌群并不是很好的卫生状况指标，因为沙门氏菌可能存在于未屠宰的禽群中，因此粪便大肠菌群试验阳性可能与屠宰后的污染无关[68]。标准的大肠菌群试验不适用于肉类是因为嗜冷肠道菌和产气单孢菌广泛分布于肉中，但粪便大肠菌群试验却很有效[47]。

大肠菌群试验广泛用于贝类食品卫生情况的检测，但它们并不总是能很好地预测其卫生质量。美国国家贝类卫生计划于 1925 年开始，大肠菌群的存在已用来评价贝类生长用水的卫生情况。通常在达到大肠菌群标准的水（“露天水”）中生长的贝类其卫生质量历来较好，但一些致病菌仍可能存在于这些贝类中。在牡蛎中，粪便大肠菌群和霍乱弧菌[12,27]或大肠杆菌和副溶血弧菌或小肠结肠炎耶尔森氏菌[36]之间没有相互关系。大肠菌群在预测鲭鱼中毒方面没有用处[36]，它们也无法预测肠道病毒的存在（见下文大肠杆菌噬菌体部分）。

虽然有一些限制，但至少在一些食物中大肠菌群作为安全性指标是有意义的。它们最好作为如第六部分 19 中所描述的 HACCP 体系的安全计划的组成部分。

18.2.2 肠球菌

人们已认识了 20 多种肠球菌，其中 16 种总结于表 18.5 中。在 1984 年之前，人们把由 2 个种组成的“粪链球菌”和 3 个亚种及牛链球菌和马肠链球菌归于一类，因为它们中的每种菌株都含有兰斯斐尔德氏 D 组抗原，后两种又属于链球菌属。

表 18.5 肠球菌特性

特性	粪肠球菌	粪渣肠球菌	马肠球菌	铅黄肠球菌	耐久肠球菌	病臭肠球菌	鹑鸡肠球菌	小肠肠球菌	蒙氏肠球菌	棉子糖肠球菌	孤立肠球菌	假鸟肠球菌	百肠肠球菌	解糖肠球菌	鸡肠球菌	殊异肠球菌
生长条件																
10℃	+	−	+	+	+	+	+	+	−	(+)	−	+		+		−
45℃	−	+	+	+	+	−	+	−	+	+	+	+	+	+		−
pH9.6	+	+	+	+	+/−	−	+	+	+				(+)	(+)		
6.5%NaCl	+	+	+	+	+/−	+	+	+	+	+	+	−	−	+	+	+
4%胆汁	+	+	+	+	+	+	+	+	+				−		+	
0.1%美兰	−		+	+	+											
0.04%亚碲酸钾	+	+	−	+		−	−		−				−			
0.01%四氮唑	+	−		+	−		−									
耐 60℃/30min	+	+	+	−	−/+	−	−								−	−
血清学 D 组	+	−	+[a]	+	+	+	+	+	+	+	−		−	−	−	
运动性	−/+	−	−	−/+	−	−	+	−	−	−	−	−	−	−	−	

续表

特性	粪肠球菌	粪渣肠球菌	马肠球菌	铅黄肠球菌	耐久肠球菌	病臭肠球菌	鹑鸡肠球菌	小肠肠球菌	蒙氏肠球菌	棉子糖肠球菌	孤立肠球菌	假鸟肠球菌	盲肠肠球菌	解糖肠球菌	鹑肠球菌	殊异肠球菌
色素	−	−	−	黄色	−		−		黄色		−		−	−	−	−
七叶苷水解	+/−	+	+	−	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
马尿酸盐水解	+/−	+	v	+/−	v	v	+	−	−	−		+	+	−	−	v
精氨酸水解酶	+	−	−	+	+	−	+	+	+						−	+
产生 H_2S		−	+	−	−	+		−	−	−	−	−	−	−	−	−
酸来自于																
甘油	−	+	+	−		v	+/−	v	v	+	−		−	−	−	+
甘露醇	+	+	+	+	−/+	+	−	−	+	+	+	−	−	+	+	−
蔗糖	+	v	+	−		−	−	+	+	+	+	−	+	+	+	+
水杨苷	+	+	+/−					+	+	+	+		+	+	+	+
乳糖	+	+	+	+	−		+	+	+	+	−	+	+	+	v	+
阿拉伯糖	−	−	−	+	−	−	+	−	−	+	−	−	−	−	+	−
蜜二糖		+/−	−	−	−	+	+	+	+	−			+	+	+	+

注：+＝阳性；−−阴性；+/−；v＝可变反应。

[a] 也为Q组。

18.2.2.1　历史背景

Escherich 首先描述了现在称为粪肠球菌的微生物，他在 1886 年命名了卵形微球菌。在 1899 年 Orla-Jensen[48] 首先认识了粪肠球菌并在 1919 年深入研究了菌种特性。由于它们存在于粪便中，在 1900 年左右人们提出将这些典型的肠球菌作为水质量的指标。Ostrolenk 等人[49]和 Burton[6]首先比较了典型的肠球菌和作为安全性指标的大肠菌群。用作水污染指标的典型肠球菌的有关特点如下：

①它们通常在水中不增殖，特别是在有机物含量低的时候。

②在人类粪便中数量通常少于大肠杆菌，粪便大肠菌群的数量达到肠球菌的 4 倍或更高，则意味着受到人类排泄废物的污染。因此，典型肠球菌试验比粪便大肠菌群的可更加准确地反映肠内致病菌的数量。

③在水中肠球菌的死亡率比大肠菌群低，因此它们的寿命通常比致病菌长。

在 20 世纪 50 年代，Buttiaux[7]提出同时使用肠球菌和大肠菌群，他认为两者的存在意味着发生了粪便污染。在他的论文的观点中，提到了人类和猪粪便样品全部含有肠球菌，而只有 86%～89%的样品含有大肠菌群。[7]。

18.2.2.2　分类和生长要求

虽然典型的肠球菌与作为水或食物卫生情况指标的大肠菌群不同，但目前它们归于一个扩展的种类，一方面，以它们作为指标而使之更加引人注意，否则，不引人注意而

没有意义。在各种哺乳动物的粪便中经常发现粪肠球菌，而粪渣肠球菌广泛分布于猪和公野猪中[40,63]；其他的一些新的菌种的自然分布却不很清楚。在1984年之前，肠球菌和"粪链球菌"在本质上属于同类并在原则上只由粪肠球菌、粪渣肠球菌和耐久肠球菌组成。目前，作为排泄物、环境卫生或质量指标，肠球菌试验不如典型菌种更有意义。表18.5中对菌种特性的检测说明盲肠肠球菌在10℃或在6.5%氯化钠溶液中不生长。虽然假鸟肠球菌在10℃生长，但在6.5%氯化钠溶液中不生长[11]。除了盲肠肠球菌，似乎其他所有菌株都在10℃生长，并且已报道粪肠球菌和粪渣肠球菌的一些菌株在0℃和6℃之间生长。许多肠球菌在45℃生长，并且一些菌株，至少包括粪肠球菌和粪渣肠球菌，在50℃生长。肠球菌、其他乳酸细菌、李斯特氏菌和索丝菌之间的系统发育关系见第七部分22(图22.1)。

在pH9.6 40%胆汁中至少有14种菌株生长，而在6.5%氯化钠溶液中有3种菌株不生长。盲肠肠球菌、鸽肠球菌、殊异肠球菌和解糖肠球菌不与血清学D组抗血清发生反应。除了与D组抗血清发生反应，只有鸟肠球菌与Q组[10]反应。粪肠球菌的胞壁质类型为赖氨酸-丙氨酸$_{2,3}$，而其他菌种含有赖氨酸-D-天冬氨酸胞壁质。肠球菌中DNA的(G+C)含量的摩尔分数37～45。至于其生化特性，全部16种菌株都可水解七叶苷。其中有2种可产生黄色素(铅黄肠球菌和蒙氏肠球菌)，有2种有运动性(铅黄肠球菌和鹑鸡肠球菌)，有2种产生硫化氢(铅黄肠球菌和病臭肠球菌)。

作为其他革兰氏阳性细菌的代表，在营养要求上肠球菌比革兰氏阴性菌更加挑剔，由于要求更多的生长因素，特别是维生素B和某些氨基酸，它们不同于许多其他的革兰氏阳性菌。对特殊氨基酸的需要，使一些菌株可以用于对这些化合物的微生物鉴定。它们比所有其他引起疾病的细菌有更广泛的pH生长范围(见第二部分3)。虽然它们为需氧菌，但它们不能产生过氧化氢酶(除了一些菌株在有氧生长中产生假过氧化氢酶)，并且它们在低Eh条件下生长很好。

18.2.2.3 分布

虽然已知2种典型肠球菌(粪肠球菌和粪渣肠球菌)主要来源于粪便，但对新的菌种的自然产生情况仍有待于进行更深入的研究，特别是出现在粪便中的情况。小肠肠球菌和耐久肠球菌较多发现于家禽和牛畜中而不是其他6种动物中，而鹑鸡肠球菌只发现于家禽中[134]。同粪肠球菌相比，耐久肠球菌和粪渣肠球菌与猪肠道有更多的联系。对于人类的肠道，后者似乎比其他菌种更加专一。盲肠肠球菌从鸡盲肠中分离，鸽肠球菌来自于鸽肠，而解糖肠球菌来自于乳牛。鸟肠球菌发现于哺乳动物和鸡粪中；铅黄肠球菌存在于青贮料、土壤中和植物上；蒙氏肠球菌存在于乳牛、挤乳工的手、土壤和植物上；小肠肠球菌存在于鸡和猪肠中；殊异肠球菌存在于某种人类样品中；鹑鸡肠球菌存在于鸡肠中。

已完全确定典型肠球菌存在于植物和昆虫及土壤中。产生黄色素的菌种特别与植物有关，盲肠肠球菌似乎与鸡盲肠有紧密联系。通常，存在于昆虫和植物上的肠球菌可能来自于动物粪便。可以认为这些肠球菌是暂时存在于粪便中并借助昆虫和风散布到植物中，它们通过以上方法，以及下雨和重力作用到达土壤[142]。虽然通常认为粪肠球菌来源于粪便，但一些菌株似乎更普遍地出现在植物上，因此当在食物中发现它们时，并不能

说明卫生情况的好坏。Mundt[43]研究了来自于人类、植物和其他来源的粪肠球菌，并且发现通过它们在石蕊牛乳中反应和它们在松三糖和蜜二糖发酵液中的发酵反应，能使非粪便来源的从众多的粪便类型区分出来。在一项对干燥冷冻食品中的粪肠球菌的2334个分离物的研究中，大多数菌株同在植物上寄居的类型有密切的相似之处，因此它们也没有任何卫生上的意义[41]。当作为食品的卫生质量的指标时，有必要确定粪肠球菌分离物是否为植物类型或它们是否代表了那些来源于人类的类型。肠球菌也可能在尘土中发现。它们分布更加广泛，特别是在诸如屠宰房和加工室一些地方，在这里加工处理猪肉制品。

关于用典型的肠球菌作为水污染指标的内容，一些研究者在研究它们在水中的存在性时，发现它们比大肠菌群死亡率更高，而其他人却发现了相反的现象。Leininger 和 McCleskey[34]指出，在水中肠球菌不增殖，正如大肠菌群有时候所表现的那样。它们较为严格的生长要求可以说明在水环境中它们的竞争能力较差。在污水中，可以发现大肠菌群和典型肠球菌数量较多，但大肠菌群几乎比肠球菌多13倍[35]。

肠球菌只由8种菌株组成，DeVries 等人[14]研究了来自于农场动物肠道的肠球菌的264种分离物。根据它们在40%胆汁和6.5%氯化钠溶液中的生长情况，挑选出这些菌株。在这264个分离物中，有255个属于8个菌种之一，其中，粪肠球菌、粪渣肠球菌和小肠肠球菌分别在分离物中占37.6%、29.8%和23%。其他的菌种为耐久肠球菌(5.1%)、鹑鸡肠球菌（1.6%）、鸟肠球菌（I.2%）、蒙氏肠球菌（1.2%）和铅黄肠球菌（<1%）。这255个分离物来自于8种动物，其中家禽、牛和猪产生分离物的量最大。

在对肉类食品中的肠球菌的最近的研究中[13]，在比利时有161种菌株从以下的食物中分离出：肉（74）、乳酪（38）、鱼和贝类（28）和乳酪-肉混合物（21）。在分离物中，粪渣肠球菌占58.4%（161中的94），粪肠球菌占26.1%（161中的42），小肠肠球菌/耐久肠球菌占9.3%（161中的15）。在以上研究中没有对最后10个菌株或一些需要命名的菌株进行鉴定。

18.2.2.4 与食品卫生质量的联系

在这部分中，主要讨论了那些在1984年之前定义的肠球菌。许多研究者发现作为食品卫生质量指标，特别是冷冻食品，典型肠球菌比大肠菌群更好。在一项研究中，肠球菌数量与好氧平板数量（APC）之间的联系比它与大肠菌群数量的联系更紧密，而大肠菌群与肠球菌比与APC联系更紧密[21]。在冷冻食品中肠球菌比大肠菌群数量更多（表18.6）。在对376个商品冷冻蔬菜样品的研究中，Burton[6]发现作为卫生情况指标，大肠菌群比冷冻前的蔬菜样品中的肠球菌更有效，而对冷冻和贮藏后的蔬菜肠球菌是更好的指标。在－20℃保存1～3个月的样品中，81%的肠球菌和75%的大肠菌群存活。1年后，89%的肠球菌存活而只有60%大肠菌群存活。在另一项研究中，在冷冻温度下保存时，肠球菌可存活400d的较长时间。14个干燥食品样品中重新发现有57%的肠球菌，而在13个不同冷冻蔬菜中有87%的样品产生这些微生物，其中许多肠球菌为植物寄居类型[41]。冷冻鱼排中的大肠菌群和肠球菌的相对寿命列于表18.7中。

总之，粪链球菌成为一个属并且发展为包括一些种的属似乎同粪便没有自然的联系，这提出了有关利用这些菌株作为卫生情况指标的问题。在20世纪60和70年代，对于各种食物都提出了肠球菌的允许量，但在最近几年人们已忽略了它们作为卫生指标的情况。

作为食品安全性指标肠球菌已不再引人注意，或许因为与此同时人们的兴趣集中在更快、更有效地检测和计数大肠杆菌的方法上。作为指标，肠球菌的大肠菌群的比较列于表18.8中。

表 18.6　　冷冻预煮炸鱼排中的肠球菌和大肠菌群的可能数量[55]

序号	肠球菌 MPN/（个/100g）	大肠菌群 MPN/（个/100g）
1	86 000	6
2	18 600	19
3	86 000	0
4	46 000	300
5	48 000	150
6	46 000	28
7	46 000	150
8	18 600	7
9	8 600	0
10	4 600	186
11	4 600	186
12	18 000	1 280
13	8 600	46
14	1 600	480
15	48 000	240
16	10 750	1 075
17	10 750	17 000
18	60 000	23 250
19	10 750	2 275
平均	32 339	2457

注：资料来源 Raj 等人[57]。

表 18.7　　在 14.4 ℃保藏对预煮冷冻炸鱼排中大肠菌群和肠球菌寿命的影响[32]

在 14.1℃保藏的天数/d	最大可能数量*	
	大肠菌群	肠球菌
0	5 600 000	15 000 000
7	6 000 000	20 000 000
14	1 100 000	13 000 000
20	760 000	11 300 000
35	440 000	11 200 000

续表

在 14.4℃保藏的天数/d	最大可能数量*	
	大肠菌群	肠球菌
49	600 000	20 000 000
63	88 000	11 000 000
77	395 000	15 000 000
91	125 000	41 000 000
119	50 000	5 400 000
133	136 000	7 400 000
179	130 000	5 600 000
207	55 000	3 500 000
242	140 000	4 000 000
273	21 000	4 000 000
289	42 000	3 200 000
347	20 000	2 300 000
410	8 000	1 600 000
446	260	2 300 000
481	66	5 000 000

注：资料来源 Kereluk 和 Gunderson[321]。

* 四次测定的平均值。

表 18.8　　作为食品卫生质量指标的大肠菌群和肠球菌的比较

性质	大肠菌群	肠球菌
形态	杆状	球状
革兰氏反应	阴性	阳性
肠道内存在情况	$10^7 \sim 10^3$/g 粪便	$10^5 \sim 10^8$/g 粪便
各种动物粪便中的存在情况	一些动物中缺少	在许多动物中存在
肠道的专一性	通常专一	通常不专一
肠道外部存在性	普遍较低	普遍较高
分离鉴定的难易	相对容易	比较难
对相反环境条件的反应	耐受性较弱	耐受性较强
对冷冻的反应	耐受性较弱	耐受性较强
冷冻食品中相对存活情况	通常低	高
干食品中相对存活情况	低	高
新鲜蔬菜中存在情况	低	通常高
鲜肉中存在情况	通常低	通常低

续表

性质	大肠菌群	肠球菌
咸肉中存在情况	低或不存在	通常高
与食物传染病肠内致病菌的关系	通常密切	较不密切
与非肠内食物传染病致病菌的关系	不密切	不密切

18.2.3 双歧杆菌

在1900年左右对婴儿粪便的研究中，Tissier[69]发现一种经常出现的微生物并称之为双歧杆菌，后来又称为双歧乳杆菌，而目前称之为两歧双歧杆菌。由于双歧杆菌在粪便中普遍存在，Mossel [39]提出用这些革兰氏阳性厌氧菌作为粪便污染特别是水的粪便污染的指标。引人注意的是：一些双歧杆菌用于生产发酵牛乳、保加利亚酸牛乳和其他食品，并且人们相信有些菌株能提供一些有益健康的成分。

双歧杆菌属至少由25种过氧化氢酶阳性、非活动性杆菌组成，它们的最低和最高生长温度范围分别为25～28℃和43～45℃，它们最佳生长pH范围为5～8，并产生乳酸和乙酸作为糖代谢作用的主要终产物。

18.2.3.1 分布

已有报道在人类粪便的水中沉积物中，双歧杆菌的浓度比大肠菌群和肠球菌高10～100倍。在冷藏温度下，3种菌株的相对死亡率次序首先为双歧杆菌，其次是大肠菌群，最后是肠球菌[20]。除了来自于粪便，一些双歧杆菌在绵羊和小牛瘤胃中含量丰富而且活跃。它们经常发现于人类和猪的粪便中，而在鸡、乳牛、狗、马、猫、绵羊、水狸、山羊和火鸡的粪便中较少。通常分离出的青春双歧杆菌和长双歧杆菌数量很多——大概为10^6/(100mL 未处理污水)[58]。由于双歧杆菌比大肠菌群和肠球菌更快死亡[41]，人们已建议把它们作为热带淡水粪便污染情况的指标。

总之，双歧杆菌同粪便有密切联系，它们存在于有粪便的地方，在水中它们生长不好，并且一些菌株只同人类粪便有特定关系，这些情况使双歧杆菌引人注意而作为污染指标。另一方面，因为它们严格厌氧，它们通常生长缓慢并且需要几天才能得到结果。由于它们更可能在肉和水产品而非蔬菜中生长（后者自然Eh较高），因此它们很可能作为肉和水产品的指标。

18.2.3.2 大肠杆菌噬菌体

20世纪20年代的研究说明出现在水中的噬菌体同它们的寄主细菌有关，这使Pas richa和de Monte[50]提出一些肠道致病菌的特定噬菌体能够作为寄主细菌的直接指标而测定。对100mL的水样含有5个或更多噬菌体的噬菌体化验过程能在4～6h内完成，在水和废水检测标准方法中描述了这种化验过程[1]。由此，可建立起对大肠杆菌菌株C的水中噬菌体化验方法。在检测大肠杆菌噬菌体的过程中，可以确定寄主菌株使所有的可见噬菌体扩展它们的噬菌区。虽然美国公众健康协会建议用大肠杆菌菌株C作为寄主，但其他寄主也可能增加噬菌斑的数量。没有办法计数全部大肠杆菌噬菌体或全部其他细

菌噬菌体，为得到较好的结果建议联合使用不同的指标[54]。

通过用大肠杆菌寄主化验大肠杆菌噬菌体，可以反映不均一噬菌体的不同生存特性，因此检测插入式噬菌体是一种使噬菌体更加均一的方法。插入式噬菌体为单一附着，均匀，并在结构和大小上类似于肠道菌病毒[22]。尽管它们的标准寄主为大肠杆菌 K-12 的 F^+或 Hfr 菌株，但通过在鼠伤害沙门氏菌中插入质粒可以构建寄主细胞。后者细胞含有 F-pili，可以作为插入大肠杆菌噬菌体的受体，并且必然以同样的方式作为大肠杆菌寄主。

18.2.3.3 在水检测中的应用

一些研究者[28,33]认为通过计数噬菌体来预测水中的粪便大肠菌群是可行的，而其他人却认为这样不可行[23]。在一项对来自 10 个城市的天然水中的大肠杆菌噬菌体及粪便大肠菌群和总大肠菌群的研究中，人们发现在两组研究对象之间存在一种线性关系[71]。

因为细菌和病毒在各自的环境中有不同的特性，所以人们会把对肠道菌病毒指标的兴趣转移到大肠杆菌噬菌体上，特别是在水中。一些研究者已报道大肠菌群指标不能正确反映肠道菌病毒在水中的存在。大肠杆菌噬菌体在水中存活说明了它们与人类肠道菌病毒的相似性[62]。在一项对沿东大西洋海岸采集的牡蛎的生长用水的研究中，大肠杆菌或大肠菌群水平都不能反映肠道菌病毒在牡蛎中的存在性[16]。在用大肠菌群标准检测认为是可接受的并安全的水中，检测到肠道菌病毒为 43%，而可用于贝类采集的水的指标只有 35%[17]。在一项对北卡罗来纳海湾的露天水的研究中，来自露天海滩的 13100g 蛤样品中有 3 个可分离出肠道菌病毒，并且来自于非露天海滩的 15 个样品中有 6 个为阳性[71]。一个详细记录说明了人们食用来自于露天水中的牡蛎会引发人类甲型肝炎[53]。

在一项比较进行不同处理的水中的大肠杆菌噬菌体、总大肠菌群、粪便大肠菌群，肠球菌和标准平板菌数的研究中，大肠杆菌噬菌体比提到的其他菌株同肠道菌病毒的联系更紧密[66]。当测定次级污水流出物中的插入式大肠杆菌噬菌体时，发现了 8200 个噬菌斑形成单位（pfu）[22]，但相对于更传统的化验方法，具体怎样化验插入式大肠杆菌噬菌体仍不清楚。已有报道在外界环境的水中一些大肠杆菌噬菌体有天然寄主，因此它们的数量可能同粪便污染没有直接的关系[60]。插入式大肠杆菌噬菌体比总大肠杆菌噬菌体更能说明水的粪便污染情况，因为低于 30℃它们不形成 F-pili，不会感染它们的 F^+寄主细胞[61]。

在水中，人类肠道病毒不仅能比大肠菌群生长得更好，而且对于氯的杀灭，这种病毒有更强的抗性。在一项研究中，氯可杀灭主要污水流出物中 99.999%的粪便大肠菌群、总大肠菌群和粪链球菌，但只能杀灭 85%～99%的病毒[37]。

18.2.3.4 在食品检测中的应用

在 1984 年 Kennedy 等人首先报道了利用大肠杆菌噬菌体化验食品中的大肠菌群。他们在 35℃做了一个 16～18h 的培养，从而从全部 18 个新鲜鸡肉和猪肠样品中重新发现了大肠杆菌噬菌体。在新鲜鸡肉中发现了大肠杆菌噬菌体的最高数量，其范围从（lg3.3～lg4.4）pfu/100g。通常较高的大肠杆菌噬菌体水平说明产品含有较多的粪便大肠菌群[29]。在以后对 12 种产品的 120 个样品的研究中，在 56%的样品和 11 种产品中，大肠杆菌噬菌体水平为 10 或大于 10pfu/100g[30]。培养 16～18h 后鲜肉中菌数达到最大数量，鸡肉中也产生最高菌数〔（lg2.66～lg4.04）pfu/100g〕。通常，大肠杆菌噬菌体同

大肠杆菌和粪便大肠菌群联系较多，而同总大肠菌群联系较少。6.0～9.0 的 pH 范围对从食物中重新发现大肠杆菌噬菌体没有影响[31]。虽然在 4～6h 内就能得到结果，但这些研究者更愿意培养 16～18h。另一方面，根据 Chesapeake Bay[9]，在 472 个蛤样品中，以鼠伤寒沙门氏菌为寄主的插入式大肠杆菌噬菌体同总大肠菌群、粪便大肠菌群或好氧平板菌数没有相互联系。较低的菌体数量可能是由于在蛤生活的水中一般污染较少。

总之，在对水、污水和食品的研究中的发现，说明大肠杆菌噬菌体化验可以用于确定大肠杆菌或大肠菌群，或作为检测肠道菌病毒的直接指标。由于在 46h 内能得到结果并且大肠杆菌噬菌体似乎同肠道菌病毒比同大肠菌群有更密切的联系，所以更深入地研究很有意义。通过所有大肠杆菌噬菌体而不仅仅是正常寄生于密切相关的肠道细菌的噬菌体使噬菌区扩大，从而发展寄主细胞系统。

18.3 预测微生物学/微生物模型

上文提到的微生物指标可用来预测食品的安全性。若没有完全性指标，则在同样的情况下本来危险的产品也是安全的。另一方面，产品能含有极低的菌数，但只要达到安全性指标就不形成危害。后者可适用于如产肠毒素葡萄球菌的许多通过食物引发传染病的致病菌。当微生物或致病菌数量较少时，有必要知道食品中发生了怎样的变化。这种变化对影响食物中微生物生长和活动的复合参数提出疑问，并且如果要预测给定产品中低菌数致病菌的生长情况，则需要知道致病菌和这些参数之间有怎样的联系。

微生物模型或预测微生物学是一种快速表现的辅助方法，它利用数学模型/方程式来预测食品中微生物的生长和（或）活动。有关预测或模拟的内容并不新奇，因为在罐装低酸性食品中进行热处理核算已应用到这些内容，这在第五部分 16 中有所描述。这里的新奇之处在于，通过利用能处理复合生长参数的、更加复杂的数学/计算模型，将其用途拓宽于食品中毒和食品腐败微生物的更加广阔的范围[2,18,38,70,73,74]。

正如第二部分 2 中所提到的，在只有温度的影响下，预测单一参数的一种微生物的生长并不困难。但当有复合参数时，难度增大，因为对于复合参数和微生物之间的联系只进行了相对较少的研究。Buchanan 和 Phillips[5]研究了单核细胞增生李斯特氏菌生长的 5 个参数的相互关系：pH、温度、亚硝酸盐、氯化钠和气体压力。在结合 Gompertz 作用并利用非线性回归分析得到的 709（!）生长曲线中配置数据后，作者得出理论模型能够对单核细胞增生李斯特氏菌的生长活动做出合理的“预先估计”。

实际应用预测微生物学要求选择适当模型来反映生长参数的影响。在许多模型中，已提出并测试了两个动力模型——非线性 Arrhenius 和 Belehradek 类型。前者的变量表示为 ln 生长率，而后者为平方根模型，其变量表示为 $\sqrt{\text{生长率}}$。Ratkowsky 等人[56]已略述并讨论了这些模型的深入发展和用途。个人和商业来源的用于预测微生物学的计算机软件也很有效。

参 考 文 献

[1] Ackland, M. R., E. R. Trewhella, J. Reeder, and F. G. Bean. 1981. The detection of microbial

spoilage in canned foods using thin-layer chromatography. *J. Appl. Bacteriol.* 51: 277～281.

[2] Adams, M. R., and M. O. Moss. 1995. *Food Microbiology*, 45-54. Cambridge: Royal Society of Chemistry.

[3] Ahamed, A., and J. R. Matches. 1983. Alcohol production by fish spoilage bacteria. *J. Food Protect.* 46: 1055～1069.

[4] American Public Health Association. 1985. *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 16th ed. Washington, DC: APHA.

[5] Buchanan, R. L., and J. G. Phillips. 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride, sodium nitrite concentrations and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 53: 370～376, 381.

[6] Burton, M. C. 1949. Comparison of coliform and enterococcus organisms as indices of pollution in frozen foods. *Food Res.* 14: 434～448.

[7] Buttiaux, R. 1959. The value of the association *Escherichiae*-Group D streptococci in the diagnosis of contamination in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 22: 153～158.

[8] Buttiaux, R., and D. A. A. Mossel. 1961. The significance of various organisms of faecal origin in foods and drinking water. *J. Appl. Bacteriol.* 24: 353～364.

[9] Chai, T. -J., T. -J. Han, R. R. Cockey, and P. C. Henry. 1990. Microbiological studies of Chesapeake Bay soft-shell clams (*Myarenaria*). *J. Food Protect.* 53: 1052～1057.

[10] Collins, M. D., D. Jones, J. A. E. Farrow, R. Kilpper-Balz, and K. H. Schleifer. 1984. *Enterococcus avium* nom. rev., comb. nov.; *E. casseliflavus* nom. ref., comb. nov.; *E. durans* nom. rev., comb. nov.; *E. gallinarum* comb. nov.; and *E. malodoratus* sp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 34: 220～223.

[11] Collins, M. D., R. R. Facklam, J. A. E. Farrow, and R. Williamson. 1989. *Enterococcus raffinosus* sp. nov.; *Enterococcus solitarus* sp. nov. and *Enterococcus pseudoavium* sp. nov. *FEMS Microbiol. Lett.* 57: 283～288.

[12] Colwell, R. R., R. J. Seidler, J. Kaper, S. W. Joseph, S. Garves, H. Lockman, D. Maneval, H. Bradford, N. Roberts, E. Remmers, I. Huq, and A. Hug. 1981. Occurrence of *Vibrio cholerae* serotype 01 in Maryland and Louisiana estuaries. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 555～558.

[13] Devriese, L. A., B. Pot, L. Van Damme, K. Kersters, and F. Hacsebrouck. 1995. Identification of *Enterococcus* species isolated from foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 26: 187～197.

[14] Devriese, L. A., A. van be Kerckhove, R. Kilpper-Balz, and K. H. Schleifer. 1987. Characterization and identification of *Enterococcus* species isolated from the intestines of animals. *Int. J. System. Bacteriol.* 37: 257～259.

[15] Escherich, T. 1885. Die Darmbacterien des Neugeborenen und Sauglings. *Fortschr. Med.* 3: 515～522, 547～554.

[16] Fugate, K. J., D. O. Cliver, and M. T. Hatch. 1975. Enteroviruses and potential bacterial indicators in Gulf coast oysters. *J. Milk Food Technol.* 38: 100～104.

[17] Gerba, C. P., S. M. Goyal, R. L. LaBelle, I. Cech, and G. F. Bodgan. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Amer. J. Pub. Hlth.* 69: 1116～1119.

[18] Gibson, A. M., N. Bratchell, and T. A. Roberts. 1988. Predicting microbial growth: Growth

responses of salmonellae in a laboratory medium as affected by pH, sodium chloride, and storage temperature. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 155～178.

[19] Griffin, A. M., and C. A. Stuart. 1940. An ecological study of the coliform bacteria. *J. Bacteriol.* 40: 83～100.

[20] Gyllenberg, H., S. Niemeia, and T. Sormunen. 1960. Survival of bifid bacteria in water as compared with that of coliform bacteria and enterococci. *Appl. Microbiol.* 8: 20～22.

[21] Hartman, P. A. 1960. *Enterococcus*: Coliform ratios in frozen chicken pies. *Appl. Microbiol.* 8: 114～116.

[22] Havelaar, A. H., and W. M. Hogeboom. 1984. A method for the enumeration of male-specific bacteriophages in sewage. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 439～447.

[23] Hilton, M. C., and G. Stotzky. 1973. Use of coliphages as indicators of water pollution. *Can. J. Microbiol.* 19: 747～751.

[24] Hollingworth, T. A., Jr., and H. R. Throm. 1982. Correlation of ethanol concentration with sensory classification of decomposition in canned salmon. *J. Food Sci.* 47: 1315～1317.

[25] International Commission on the Microbiological Specifications for Foods. 1986. *Microorganisms in Foods. 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Application*, 2d ed. Toronto: University of Toronto Press.

[26] Jay, J. M. 1994. Indicator organisms in foods. In *Foodborne Disease Handbook, Vol. 1*, eds. Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murrell, and D. O. Cliver, 537～546. New York: Marcel Dekker.

[27] Kaper, J., H. Lockman, R. R. Colwell, and S. W. Joseph. 1979. Ecology, serology, and enterotoxin production by *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 91～103.

[28] Kenard, R. P., and R. S. Valentine. 1974. Rapid determination of the presence of enteric bacteria in water. *Appl. Microbiol.* 27: 484～487.

[29] Kennedy, J. E., Jr., J. L. Oblinger, and G. Bitton. 1984. Recovery of coliphages from chicken, pork sausage and delicatessen meats. *J. Food Protect.* 47: 623～626.

[30] Kennedy, J. E., Jr., C. I. Wei, and J. L. Oblinger. 1986. Methodology for enumeration of coliphages in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 956～962.

[31] Kennedy, J. E., Jr., C. I. Wei, and J. L. Oblinger. 1986. Distribution of coliphages in various foods. *J. Food Protect.* 49: 944～951.

[32] Kereluk, K., and M. F. Gunderson. 1959. Studies on the bacteriological quality of frozen meats. IV. Longevity studies on the coliform bacteria and enterococci at low temperatures. *Appl. Microbiol.* 7: 327～328.

[33] Kott, Y., N. Roze, S. Sperber, and N. Betzer. 1974. Bacteriophages as viral pollution indicators. *Water Res.* 8: 165～171.

[34] Leininger, H. V., and C. S. McCleskey. 1953. Bacterial indicators of pollution in surface waters. *Appl. Microbiol.* 1: 119～124.

[35] Litsky, W., M. J. Rosenbaum, and R. L. France. 1953. A comparison of the most probable numbers of coliform bacteria and enterococci in raw sewage. *Appl. Microbiol.* 1: 247～250.

[36] Matches, J. R., and C. Abeyta. 1983. Indicator organisms in fish and shellfish. *Food Technol.* 37 (6): 114～117.

[37] McCrady, M. H., and Em. Langevin. 1932. The coli-aerogenes determination in pasteurization control. *J. Dairy Sci.* 15: 321～329.

[38] McMeekin, T. A., J. N. Olley, T. Ross, and D. A. Ratkowsky. 1993. *Predictive Microbiology: Theory and Application*. New York: Wiley.

[39] Mossel, D. A. A. 1958. The suitability of bifidobacteria as part of a more extended bacterial association, indicating faecal contamination of foods. In *Proceedings, 7th International Congress on Microbiology, Abstracts of Papers*, 440～441. Uppsala: Almquist & Wikesells.

[40] Mundt, J. O. 1982. The ecology of the streptococci. *Microbiol. Ecol.* 8: 355～369.

[41] Mundt, J. O. 1976. Streptococci in dried and frozen foods. *J. Milk Food Technol.* 39: 413～416.

[42] Mundt, J. O. 1961. Occurrence of enterococci: Bud, blossom, and soil studies. *Appl. Microbiol.* 9: 541～544.

[43] Mundt, J. O. 1973. Litmus milk reaction as a distinguishing feature between *Streptococcus faecalis* of human and nonhuman origins. *J. Milk Food Technol.* 36: 364～367.

[44] Munoa, F. J., and R. Pares. 1988. Selective medium for isolation and enumeration of *Bifidobacterium* spp. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1715～1718.

[45] Murdock, D. I. 1968. Diacetyl test as a quality control tool in processing frozen concentrated orange juice. *Food Technol.* 22: 90～94.

[46] Murdock, D. I. 1967. Methods employed by the citrus concentrate industry for detecting diacetyl and acetylmethylcarbinol. *Food Technol.* 21: 643～672.

[47] Newton, K. G. 1979. Value of coliform tests for assessing meat quality. *J. Appl. Bacteriol.* 47: 303～307.

[48] Orla-Jensen, S. H. 1919. The lactic acid bacteria. *Mem. Acad. Roy. Soc. Denmark Ser.* 85: 81～197.

[49] Ostrolenk, M., N. Kramer, and R. C. Cleverdon. 1947. Comparative studies of enterococci and *Escherichia coli* as indices of pollution. *J. Bacteriol.* 53: 197～203.

[50] Pasricha, C. L., and A. J. H. DeMonte. 1941. Bacteriophagas as an index of water contamination *Indian Med. Gaz.* 76: 492～493.

[51] Peabody, F. R. 1963. Microbial indexes of food quality: The coliform group. In *Microbiological Quality of Foods*, ed. L. W. Slanetz, C. O. Chichester, A. R. Gaufin, and Z. J. Ordal, 113～118. New York: Academic Press.

[52] Perry, C. A., and A. A. Hajna. 1944. Further evaluation of EC medium for the isolation of coliform bacteria and *Escherichia coli*. *Amer. J. Pub. Hlth.* 34: 735～738.

[53] Portnoy, B. L., P. A. Mackowiak, C. T. Caraway, J. A. Walker, T. W. McKinley, and C. A. Klein, Jr. 1975. Oyster-associated hepatitis: Failure of shelfish certification programs to prevent outbreaks. *J. Amer. Med. Assoc.* 233: 1065～1068.

[54] Primrose, S. B., N. D. Seeley, K. B. Logan, and J. W. Nicolson. 1982. Methods for studying aquatic bacteriophage ecology. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 694～701.

[55] Raj, H., W. J. Wiebe, and J. Liston. 1961. Detection and enumeration of fecal indicator organisms in frozen sea foods. *Appl. Microbiol.* 9: 433～438.

[56] Ratkowsky, D. A., T. Ross, T. A. McMeekin, and J. Olley. 1991. Comparison of Arrheniustype and Belehrádek-type models for prediction of bacterial growth in foods. *J. Appl. Bacteriol.* 71:

452～459.

[57] Reinbold, G. W. 1983. Indicator organisms in dairy products. *Food Technol.* 37 (6): 111～113.

[58] Resnick, I. G., and M. A. Levin. 1981. Assessment of bifidobacteria as indicators of human fecal pollution. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 433～438.

[59] Schardinger, F. 1892. Über das Vorkommen Gährung erregender Spaltpilze im Trinkwasser und ihre Bedeutung für die hygienische Beurtheilung desselben. *Wien. Klin. Wachr.* 5: 403～405, 421～423.

[60] Seeley, N. D., and S. B. Primrose. 1982. The isolation of bacteriophages from the environment. *J. Appl. Bacteriol.* 53: 1～17.

[61] Seeley, N. D., and S. B. Primrose. 1980. The effect of temperature on the ecology of aquatic bacteriophages. *J. Gen. Virol.* 46: 87～95.

[62] Simkova, A., and J. Cervenka. 1981. Coliphages as ecological indicators of enteroviruses in various water systems. *Bull. WHO* 59: 611～618.

[63] Slanetz, L. W., and C. H. Bartley. 1964. Detection and sanitary significance of fecal streptococci in water. *Amer. J. Pub. Hlth.* 54: 609～614.

[64] Smith, T. 1895. Notes on *Bacillus coli commune* and related forms, together with some suggestions concerning the bacteriological examination of drinking water. *Amer. J. Med. Sci.* 110: 283～302.

[65] Splittstoesser, D. F. 1983. Indicator organisms on frozen vegetables. *Food Technol.* 37 (6): 105～106.

[66] Stetler, R. E. 1984. Coliphages as indicators of enteroviruses. *Appl. Environ. Microbiol.* 46: 668～670.

[67] Szabo, R. A., E. C. D. Todd, and A. Jean. 1986. Method to isolate *Escherichia coli* 0157: H7 from food. *J. Food Protect.* 49: 768～772.

[68] Tompkin, R. B. 1983. Indicator organisms in meat and poultry products. *Food Technol.* 37 (6): 107～110.

[69] Tissier, H. 1908. Recherches sur la flore intestinale normale des enfants agés d'un an à cinq ans. *Ann. Inst. Past.* 22: 189～208.

[70] Van Impe, J. F., B. M. Nicolai, M. Schellekens, T. Martens, and J. D. Baerdemaeker. 1995. Predictive microbiology in a dynamic environment: A system theory approach. *Int. J. Food Microbiol.* 25: 227～249.

[71] Wait, D. A., C. R. Hackney, R. J. Carrick, G. Lovelace, and M. D. Sobsey. 1983. Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J. Food Protect.* 46: 493～496.

[72] Wentsel, R. S., P. E. O'Neill, and J. F. Kitchens. 1982. Evaluation of coliphage detection as a rapid indicator of water quality. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 430～434.

[73] Whiting, R. C., and R. L. Buchanan. 1994. Microbial modeling. *Food Technol.* 48 (6): 113～120.

[74] Zwietering, M. H., T. Wijtzes, J. C. De Wit, and K. v't. Riet. 1992. A decision support system for prediction of the microbial spoilage in foods. *J. Food Protect.* 55: 973～979.

19. HACCP 体系和食品安全性

良好的食品质量包括避免微生物的污染。尽管在良好生产操作规程（GMP）下不可能达到无菌，但人们渴望达到的目标是食品产品尽可能带最少的微生物。目前越来越少的加工者生产越来越多的产品就导致食品在到达消费者之前经历较长时间的保存和运输，在这种情况下需要新的方法来保证食品的安全性。典型的微生物质量控制的方法较多，都是依赖于对未加工材料和终产品的微生物检测，但对于许多产品来说，得到鉴定结果所需时间太长了。快速方法的发展和应用就显的很有意义，但这些方法的应用也不可避免的需要新的方法来保证食品的安全性。在本部分，危害分析关键控制点体系(HACCP)是用来保证从农场到家庭的食品安全性的方法。必要的时候对食品和食品成分需要建立起微生物标准，并且与采样方案一起都作为 HACCP 体系的组成部分。

19.1 危害分析关键控制点体系（HACCP）

1971 年 Pillsbury 公司与美国国家航空航天管理局（NASA）以及美国军用研究实验室在合作过程中，H. E. Bauman 和其他科学家研究和制定出 HACCP 体系的概念和内容。并且在食品保藏的全国会议上首次提出了 HACCP 的概念[10,24]。虽然在这次会议进程中只是一项提议，但随后于 1974 年出版了 HACCP 体系的全部细节[4]。HACCP 体系最早只应用在低酸性罐头食品，目前已经应用于整个食品工业的大多数产品和食品服务业[5,6,7]。国际食品微生物专业委员会（ICMSF）已经出版了其用途的详细报告[17]。关于 HACCP 的下面所列的更多信息可从所标注的参考资料中获得：早期发展情况[3,28]；肉禽的检测[1]，水产品[15]，肉禽制品生产[33]和冷冻食品[20]；一般食品工业[31]；操作的灵活性[2]；在加拿大的应用情况[13]；以及沙门氏菌病的控制[26,27]。

HACCP 体系，是一种通过对加工中可能出现，以及来自于滥用的未加工材料所造成污染的危害性的分析，来保证食品生产的微生物安全性。虽然一些用于食品安全性的典型方法大多取决于对终产品的测定，但 HACCP 体系的重点放在以达到生产安全产品为前提来合理控制食品成分的质量和加工步骤。因此该体系选定控制生产和制备过程中关键点上的微生物。1961—1982 年期间，在美国爆发的 5 个食品传染的疾病的主要因素列于表 19.1 中，应该注意到的是这些食品传染的疾病与食品的处理和加工有关[8]。1984 年加拿大食品服务机构的食品加工中的失误造成了大约 39% 食品传染事件[32]。在食品服务机构和家庭中合理使用 HACCP 体系也将减少食品传染病的发生。

表 19.1 在美国爆发的由食物引起的传染病的主要因素[7,8]

因素	1961—1982 年	1973～1982 年
不当的冷却	44%	56%
制备与食用之间有 12h 或更长的时间间隔	23	31
由加工者造成的染菌	18	24
加入未加热或蒸煮的生原料	16	9
不充分的蒸煮/储藏/加热	16	20

美国国家研究委员会和美国国家科学院的一个小组委员会于 1985 年作出了以下的建议[25]：由于 HACCP 体系的应用提供了用来控制食品出现的微生物危害的许多特殊和关键的方法，因此工业上应该使用该体系，这个小组委员会建议负责控制食品中微生物危害的政府机构应该颁布在食品保藏过程中要求应用 HACCP 体系的合理的法规。

ICMSF (16)、CFP、美国国家食品微生物标准顾问委员会 [NACMCF (22)] 和其他国家已经认可 HACCP 体系。

19.1.1 定义

以下内容在 HACCP 体系发展和应用中很有意义，它们来自 ICMSF[1,6] 和（或）NACMCF[22]：

①控制点：特定食物系统中的任何点，在失去控制的情况下不会造成难以接受的健康危害。

②关键控制点 (CCP)：食品系统中的任何点或程序，能对系统进行控制并可减小或避免食品中微生物对健康的危害。

③关键限度：必须有一个或多个指定的容差以保证关键控制点 (CCP) 能够有效地控制微生物对健康的危害。

④偏差：未能满足关键控制点 (CCP) 所要求的关键限度。

⑤HACCP 计划：按照这些规定所得到的正式操作程序的文件。

⑥危害：任何生物的、化学的、物理的物质可能对消费者健康带来难以接受的危害（想不到的染菌，毒素水平，不需要的微生物的生长和/或生存）。

⑦监控：对 CCP 目标水平和容差进行--系列有计划的观察和测量，并形成一个准确的纪录，以保证在关键限度内保持产品的安全性。

⑧危险种类：由食品带来的六种主要危险中的任何一种。

⑨验证：采用一定的方法，按一定步骤，并进行试验来确定 HACCP 体系是否与 HACCP 计划一致。

19.1.2 HACCP 原理

虽然人们对 HACCP 有不同的解释，但 ICMSF 和 NACMCF 认为 HACCP 是食物安

全性方面的一种自然的系统方法，它由以下七种原理组成：

①进行危害和危险性分析，这些危害和危险性与食物的生长、收获、原料、成分、加工、手工处理、分配、销售、制备和消费等存在问题有关；

②确定在工艺中能够鉴别控制微生物危害的 CCP；

③制定为保证各 CCP 处于控制之下而必须达到的目标水平和容差；

④建立程序监控 CCP；

⑤制定当监控发现某一特定 CCP 超出控制范围时应采取的修正行为；

⑥建立有效的档案制度以保持 HACCP 体系与计划一致；

⑦建立验证程序以证实 HACCP 体系正常工作。

下面详细讨论其中每个原理。

19.1.2.1 原理 1 进行危害性和危险性分析

对于只有一种成分的食物，可用流程图或用①～⑥标明食物中危害发生概率的大小来排列终产品质量好坏的次序，进而评价食物的危害性和危险性。加号（＋）标明危害存在。NACMCF 已定义了 6 种危害[22]，扩展了 NRC[26]提出的控制沙门氏菌的三点内容：

①用未灭菌制品制成的出售给个人的特定食物中存在危险性，这些人包括婴儿、成人、老年人和免疫人低下的人。

②产品（如牛乳、鲜肉）中含有对微生物“敏感”的成分。

③加工中未能进行有效杀灭有害微生物的过程（如巴氏消毒法）。

④ 加工后的产品在未包装前重新染菌（如大量产品巴氏灭菌后再分别包装）。

⑤销售中错误处理和/或由消费者错误使用所带来的潜在危害所造成产品在消费中具有的危害性（如产品在高于冰箱温度下冷藏）。

⑥在包装或在家庭中蒸煮后没有进行最后的热处理。

其次，配方制品应为 6 种危害之一，NACMCF 从 NRC[25]提出的四个建议中扩展了这些内容：

Ⅵ. 出售给个人的未灭菌制品为危害种类 A

Ⅴ. 具有全部五种一般危害性的食品（B、C、D、E 和 F）

Ⅳ. 具有任何四种一般危害性的食品

Ⅲ. 具有任何三种一般危害性的食品

Ⅱ. 具有任何二种一般危害性的食品

Ⅰ. 具有任何一种一般危害性的食品

0. 无害的制品

19.1.2.2 原理 2 确定 CCP

ICMSF[17]认识到两种类型的 CCP：CCP1 为控制危害和 CCP2 为减小危害。以下是典型的 CCP：

①一定温度下保持一定时间的热处理过程，以杀灭存在的病菌。

②冷冻及病菌繁殖前的冷冻时间。

③食品中保持抑制病菌生长的 pH。

④工作人员的卫生状况。

如图 19.1 的树型图常用于确定 CCP。

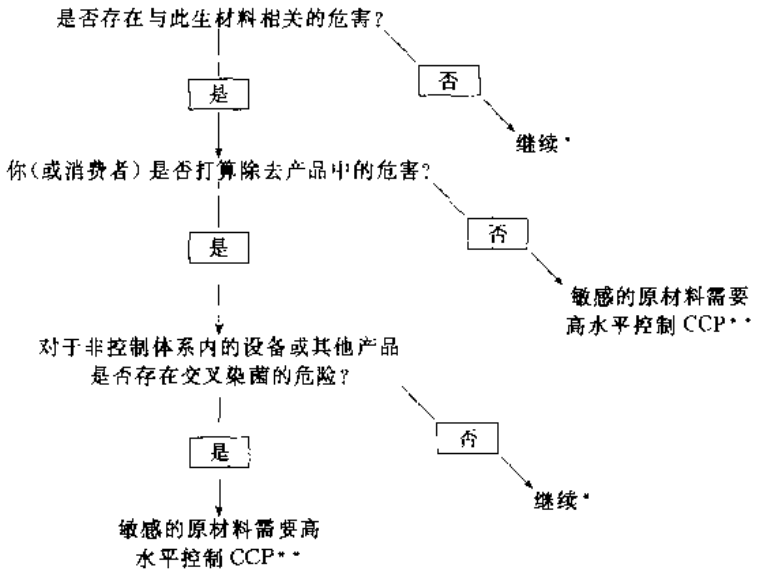


图 19.1 原材料控制的树形图[21]

(取自 *Mortimore* 和 *Wallace* (21)。*Copyright* ©1994 *by Chapman & Hall*)。

注: * 继续进行你的下一个原材料。

** 随着危险性分析,你或许发现此原材料必须作为一个 CCP 来管理。

19.1.2.3 原理 3 建立关键限度

关键限度是一个或多个满足规定的容差,它必须满足规定以保证一个 CCP 有效控制微生物危害。这或许意味着在某一特定的狭窄温度范围内保持冷冻温度或在某一最小破坏温度下保持足以有效破坏病菌的较长时间。后者的例子可根据表 19.2 中的温度来分别控制微生物。

表 19.2 易腐的未加工肉禽制品的 USDA 烹调和冷却参数

烹调参数	
USDA/FSIS 已设置烹调易腐的未加工肉禽制品所需的最低内部温度。这些温度要求可参考 CFR 的标题 9 (CFR301-390) 或 FSIS 政策书籍或公告发布的政策规定	
烹调要求*	
熟牛肉和烤牛肉	54.4～62.7℃
(9CFR318.17)	
(54.4℃ 121min 立即升至 62.8℃)	
烤肉面包	71.1℃
(9CFR317.8)	
烤肉块	170℃
(9CFR317.8)	76.7℃

续表

猪肉（杀灭旋毛虫）	48.9～62.2℃
(9CFR318.10)	
(48.9℃ 21h 立即升至 62.2℃)	
熟禽肉卷和其他未加工的家禽制品	71.1℃
(9CFR381.150)	
腌制的熟鸭	68.3℃
(FSIS 政策书籍)	
鸡肉冻肉糕	71.1℃
(FSIS 政策书籍)	
部分熟的、粉碎制品	≥66.1℃ 1min
(FSIS 公告 92-85)	≥64.4℃ 2min
	≥63.3℃ 3min
	≥62.7℃ 4min
	≥62.2℃ 5min
冷却参数	
类似于烹调和冷藏保存制品的参数，包括温度和时间，反映在机构的法规（9CFR）和政策中	
冷却要求	
建议的冷藏温度和内部温度控制点	4.4℃
保存期超过一周的建议冷藏温度 (FSIS 规定 7110.3)	1.7℃
冷却过程要求制品的内部温度在 54.4℃和 26.7℃之间不超过 1.5h 或在 26.7℃和 4.4℃之间不超过 5h（FSIS 规定 7110.3）。	
由完整肌肉（如烤牛肉）组成的制品的冷却过程要求冷却在 90min 的烹调周期中开始。制品应在 6h 内从 48℃冷却到 12.7℃。冷却过程应持续进行直到达到 4.4℃才进行包装运输（9CFR318.17）	
出口英国的烤牛肉必须在离开烹调锅后 5h 内冷却到 20℃或更低温度，并在随后的 3h 内冷却到 7℃或更低温度	

* 一些温度要求是根据食物表面和试验特性而非安全性设置的。

19.1.2.4 原理 4 建立监控 CCP 的程序

CCP 的监控包括对一个 CCP 目标水平和容差进行有计划地测定或观察，监控结果必须记录 。例如，若某一过程的温度不应超过 40℃，那么可以建立一个图表记录。由于需要较长时间才能得到结果，因此该点的微生物数量通常并不是真正需要的。物理和化学参数例如：时间、pH、温度和 A_w 可以立即测定并得到结果。关于监控 HACCP 体系的更详细情况见 Corlett[1]。

19.1.2.5 原理 5 当在监控 CCP 中出现偏差时采取改正措施

必须采取措施消除由于偏离计划而带来的危害。如果由于偏离计划而使产品可能具有危险性，那么必须清除产品。通常采取的措施可能不同，但最终结果必须使 CCP 在控制范围之内。

19.1.2.6 原理 6 建立有效的 HACCP 计划档案制度

食品机构的 HACCP 计划必须存档，并达到官方检查的要求。记录和保存体系的形式可以有所发展，换句话说可以对标准格式进行必要的修改。典型的形式是按照规定完成并保存。这些格式应包括材料、加工过程、包装、保存和发售的全部内容。

19.1.2.7 原理 7 建立验证程序以证实 HACCP 体系正常工作

按一定步骤采用一定的方法进行试验来证实体系与计划的一致性。证实的情况说明在发展计划的同时在 HACCP 计划中可鉴别所有危害，并且验证方法的某些方面可能与建立的一系列微生物标准一致。验证措施包括建立验证过程中的检查计划、复查 HACCP、CCP 记录、偏差、随机样品收集和分析，以及验证过程中的检查记录。验证检查报告应包括管理和更新 HACCP 计划的负责人，在操作中直接监控 CCP 数据，证明监控设备性能良好及使用的纠偏措施。

19.1.3 流程图

对于某个食品机构，HACCP 计划是从为整个加工过程建立一个流程图所开始。流程图应从获得原料开始，并且包括贯穿于包装和最终销售的全过程。典型的冷冻馅饼的生产流程如图 19.2。流程图中的生产设备应是特定的，并且随着生产过程的改变而更新。它的建立应该是工程、质量保证、生产、微生物、卫生、包装等各方面的所有个人的共同努力的结果[33]。流程图将用于确定危害位置和 CCP。

冷冻馅饼的制造过程可以说明 HACCP 在此过程中的应用（图 19.2）。

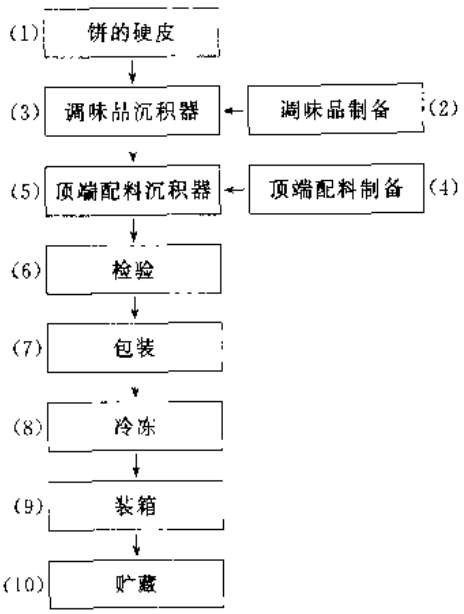


图 19.2 制造冷冻馅饼流程图和关键控制点

注：资料来自于 Corlett，D. A.，Jr.，基于食品危害性分析的微生物标准的选择，120-121，食品防护技术，Felix，C. W. 等。

生产的描述：对馅饼进行配制和冷冻是用于零售。产品必须食用安全而不需再加工，但包装上的说明指出产品应在消费前加热。

成分的危险性分析和涉及的微生物：这些列于表 19.3 中。

关键控制点：这些列于表 19.4 中并与图 19.2 中的流程图上的数字有关。如果把 CCP

分类，调味品和顶端配料的制备[2,4]和冷冻[8]是 CCP1，检验[6]和保存[10]是 CCP2。

生产烤牛肉的流程图如图 19.3 所示。对于这种产品，烹调是最重要的 CCP (CCP1)，其次是冷却和防止烹调后再染菌。烹调温度应达到 62.7℃，或足以影响单核细胞增生李斯特菌的降低 4 个对数周期。但这不会破坏产气荚膜梭状芽孢杆菌的芽孢，必须通过适当的冷冻和保藏来控制它们的发芽和生长。易腐的未加工肉的烹调和冷却参数列于表 19.2 中。

表 19.3　　馅饼成分中的微生物[12]

成　分	相关微生物
饼皮	葡萄球菌
调味品	无，低 pH
乳酪	葡萄球菌（肠毒素） 沙门氏菌 大肠杆菌（EPEC，ETEC，EIEC 菌株）
香肠	沙门氏菌 葡萄球菌（肠毒素）
香料	沙门氏菌
蔬菜	沙门氏菌

表 19.4　　馅饼加工过程关键控制点

流程图数字和步骤[a]	关键控制类型
1　饼皮	在面上建立 SPC 限，确定适当的保存温度/时间
2，4 调味品/顶端配料制备	在成分上建立微生物限，器皿卫生，保藏温度/时间
3，5 调味品/顶端配料沉积	器皿/设备的卫生
6　检验	设备卫生，雇员卫生情况
7　冷冻	冷冻的适宜的内部温度和时间
8　装箱	对终产品建立微生物限
9　保藏	检查内部冷冻温度

[a] 来自图 19.1。

19.1.4　HACCP 的一些限制

尽管 HACCP 是控制食物从收获到消费中微生物危害的最好的体系，但在食品生产和服务业中统一使用 HACCP 也将会有一些问题。以下是 Tompkin[33]提出的问题和思考：

①HACCP 要求对非专业食品加工者进行教育，特别是在饮食服务业和家庭中；能否实现还需静观以待。这些人若未能正确理解 HACCP 将会带来一些错误。

②食品专家和食品检验人员及社会都必须接受这个概念才能使其更加有效。它在任何程度上的无效应用都会影响它对产品的全部成效。

③可以预料，对于给定程序是否是一个 CCP 及怎样最有效地监控这些程序，专家将存在不同意见，这潜在地削弱了其他人对 HACCP 的信任。

④工业上采用 HACCP 可能会给消费者带来产品安全性的错误保证，因此没有必要在购买和消费产品之间进行通常的预防。有必要告知消费者许多由食物引起的传染病的发生，是由于家庭中和饮食服务机构中错误处理食品而引起的，并且无论采取什么措施，都必须在食品出售后继续监控 HACC 体系。

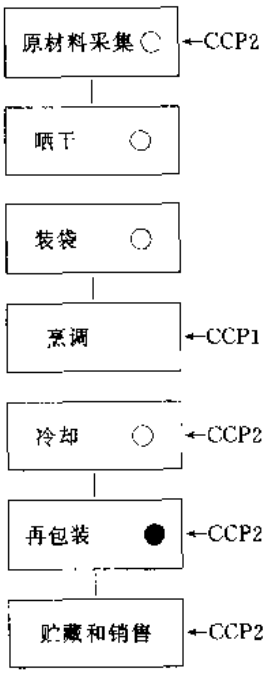


图 19.3 生产烤牛肉流程图[17]

○- 指示次要染菌位置

●—指示主要染菌位置

CCP1 有效 CCP、CCP2 不完全

19.2 微生物指标

早在 1903 年，Marxer 就曾提出用微生物指标指示一些食品的安全性或整体特性的内容（见参考文献 14），他指出牛排肉中好氧平板微生物数量（APC）限制为 10^6。同样，19 世纪 20～30 年代许多其他产品也建议使用 APC 和指示微生物限定，在广泛接受该限定的产品中，巴氏消毒牛奶很引人注意。前面已有所回顾关于食物微生物限定的早期历史[14]。为了避免混淆并达成国际上的一致，Codex Alimentarius 委员会[9]已建立了有关规定。ICMSF 已对 Codex 规定进行了一些修改。以下是 Codex 规定的概述，其中记录了 ICMSF 修改的内容。

19.2.1 规定

微生物标准主要有两种：强制使用的标准和建议使用的标准。强制标准是只对公众健康有影响的病菌进行控制的微生物标准，而对非病菌可能进行限制。ICMSF[16]认为，作为法律或规定的一部分，据有司法权的正规机构应强制实行这些标准。建议标准也是一种终产品的微生物特定标准，用来加强已满足卫生要求的安全保证（其中可能包括腐败微生物）或一种微生物指标，在食品机构中用来监控加工中或加工后的某点的卫生情况（其中也可能包括非致病菌）。在建议使用一种标准之前，ICMSF[16]确信每种产品都已进入国际市场，一定有充分的流行病学依据证明这些产品与涉及由食物引起的传染病有关，也有依据证明使用微生物标准将减少原理 2 中的潜在危害。

微生物标准的 Codex 规定是由五部分组成：

①相关微生物和（或）它们的毒素的介绍。

②检测和定量检测微生物的分析方法。

③采样方案，包括什么时间和在什么地点取样。

④适用于食物的微生物限制。

⑤符合这些微生物限制的样品单位的数量。

这五个组成部分在一个采样方案中体现。

19.2.2 采样方案

采样方案说明了标准的可接受性，它在用特定方法合理检验需要的样品单位数量的基础上应用广泛。它包括采样程序和确定标准两部分，并且可能是一个二级或三级的计划。

二级计划包括以下具体内容：n，c，m，三级计划则包括 n，c，m 和 M，这里：

n＝取自大量的必须经检验满足给定采样方案的样品单位（包装，牛肉馅饼等等）数量；

c＝可能超过微生物标准 m 的样品单位的最大可接受量或最小允许量。当数量超过标准时，则排除这一批样品；

m＝每克样品中相关细菌的最大数量或水平，高于此水平的数量也是恰好可接受的或不可接受的。

它用于在二级计划中从质量上不可接受的食物中分离可接受食物，或在三级计划中，从恰好质量可接受的食物中分离质量更好的食物。在存在问题的食品中可接受或可达到的微生物水平为 m。对于二级计划中的存在/不存在微生物的情况，它通常说明 $m=0$ 。对于三级计划，m 通常为非零水平。

M＝从质量上不可接受的食物中分离恰好可接受食物的数量。仅用于三级计划。任何样品中等于或高于 M 的量是不可接受的，这些样品也与对健康的危害、卫生情况指示或潜在腐败有关。

二级计划是两个计划中较简单的，在其最简单的形式中，可以通过如 $n=5$，$c=0$ 的计划确定存在/缺少从而接受或排除一大批食物，这里 $n=5$ 意味着将对这批样品中 5 个

单一个体中的沙门氏菌的存在进行微生物检验，$c=0$ 意味着通过对这批可接受的样品依次进行检验，这 5 个样品全部对微生物开放。若所有样品个体对沙门氏菌为阳性，则排除全部样品。如果在存在/不存在试验中，5 个样品中有 2 个可能含有大肠菌群，那么采样方案将为 $n=5$，$c=2$。由此计划，若 5 个样品个体中有 3 个或更多含有大肠菌群，则排除整批样品。而对于沙门氏菌，存在/不存在情况通常为指示微生物数量的允许最上限，例如大肠菌群通常为这种情况。如果在 5 个样品个体中有 2 个允许达到 100 个大肠菌群/g，采样方案将为 $n=5$，$c=2$，$m=10^2$。在检验 5 个样品的大肠菌群后，若 5 个样品中不多于 2 个含有 10 个大肠菌群/g，则这批样品可接受，而如果 5 个样品中有 3 个或更多含有 10^2 个大肠菌群/g，则排除这批样品。通过提高 n（如，$n=10$，$c=2$，$m=10^2$）或减少 c（如，$n=5$，$c=1$，$m=10^2$），可以使这个采样方案更加严格。另一方面，通过提高 c 给定 n，可以使它更加宽限。

二级计划可以指明可接受/不可接受食物，而三级计划可指明可接受/恰好可接受/不可接受食物。为了描述一个典型三级计划，可假设某个给定的食品，其标准平板菌数（SPC）不应超过 10^6/g（M）或在 5 个检验样品个体中有 3 个或更多高于 10^5/g。因此该计划具体为 $n=5$，$c=2$，$m=10^5$，$M=10^6$。若 5 个样品个体都超过 10^6/g，则排除整批样品（不可接受）。若不多于 c 个样品个体的菌数高于 m，则这批样品可接受。与二级计划不同，三级计划在 m 和 M 之间（恰好可接受）有量的区分。

在二级或三级计划中，通过参考恰当的表格[16]中的数字 n 和 c，可发现大批食物被接受的可能性(P_a)。通过二级计划要求的存在/不存在试验或三级计划要求的数量或浓度试验，可确定采用二级还是三级计划。后者具有一些优点，通过样品个体的非随机变化它可受到较少的影响，另外它能够测定在 m 到 M 范围中菌数出现的频率。有关采样方案的背景、用途和解释的更多的详细内容可参考 ICMSF 的报告和建议[16]。更多的内容也可从 Kilsby[18]获取。

19.2.3 微生物标准和食品安全性

在缺少 HACCP 体系的情况下，应用食品微生物标准可能不如两者联合使用更有效。因此，微生物标准最好能够作为综合方案的一部分。当标准不作为食品安全性或质量的系统方法的组成部分时，得到的结果不会令人满意，正如 Miskimin 等人[34]和 Solberg 等人[30]所发现的情况。这些研究者研究了 1000 多种食物样品，包括 853 个即食食品和 180 个生的食品。他们应用 APC，大肠菌群和大肠杆菌中任意的标准并测定这些标准的有效性，从而评价与金黄色葡萄球菌、产气芽孢杆菌和沙门氏菌有关的食品的安全性。对于生食品，尽管 3 种病菌中有 1 种或更多存在于食物中，但低于 10^6/g 的 APC 标准说明 47%的样品可接受，而未分离出病菌的 5%排除，总体上有 52%的样品测定有误。对于即食食品，少于 10^5/g 的 APC 说明仅有 5%的含有致病菌的样品可接受，而未产生致病菌的 10%排除。在一定程度上类似，少于 10^2/g 的大肠菌群标准测定结果表明生食品有 34%测定有误，而即食食品为 15%。至于少于 3/g 的大肠杆菌标准，即食食品中有更低比率的样品测定有误（13%），而同样的标准用于生食品，30%的样品测定有误。虽然在两种形式的食品中都可发现少于 3 种致病菌，但在 4 年的研究中没有报道发生过由食物

引起的传染病，在此期间人们消费了多于 1600 万种食物[29]。

这些发现显示了来自 Rutgers 食品部门计划的一些原始数据。经过 17 年的实验，通过在测定试验，食品审计，清洗评定中进行修改，并且使用了多于 3000 万种的食物，HACCP 体系已非常有效[29]。对于生食品和即食食品，这个方案中使用的微生物指标列于表 19.5。在 1983～1989 年中，检测了 1600 多种食物样品，只有 1.24%含有病原菌，而蛋白沙拉通常感染这些病原菌（4.3%）。样品中微生物检测失败的食物为生菜（它们含有过多的大肠菌群）[29]。Rutgers 食品部门提出的以 HACCP 为基础的体系是一个如何使微生物标准更加完整以用于食品安全性检测的例子。在一项 17 年的计划中，没有发生由食物引起的传染病[29]。

表 19.5　　ICMSF 采样方案和建议的微生物指标

产品	检验	分级						评注
		事件	计划	n	c	m	M	
预煮的拌粉鱼肉	APC	2	3	5	2	5×10^5	10^7	产品可能处理有误
	大肠杆菌	5	3	5	2	11	500	
	金黄色葡萄球菌	8	3	5	1	10^3	10^4	
加工中的生鸡肉（新鲜或冷冻）	APC	1	3	5	3	5×10^5	$\times10^7$	厂内加工
冷冻蔬菜和水果 pH4.5	大肠杆菌	5	3	5	2	10^2	10^3	m 值估计
生碎肉（冷冻）和冷却胴体肉	APC	1	3	5	3	10^6	10^7	厂内控制
谷物	霉菌	5	3	5	2	10^2—10^4	10^5	m 值估计
含有大米或玉米粉为主要成分的冷冻主菜	金黄色葡萄球菌	8	3	5	1	10^3	10^4	m 值估计
不含碳酸气的天然矿泉水和瓶装水	大肠菌群	5	2	5	0	0	—	不用于婴儿配方食品等
烤牛肉	沙门氏菌	12	2	20	0	0	—	
	金黄色葡萄球菌	7	3	5	2	10^3	10^4	
	副溶血弧菌	8	3	5	1	10^2	10^3	
	沙门氏菌[a]	10	2	5	0	0	—	
	APC[b]	2	3	5	2	5×10^5	10^7	
	大肠杆菌[b]	5	3	5	2	11	500	
	金黄色葡萄球菌[b]	8	2	5	0	10^3	—	

注：除了注明用于厂内，它们主要用于国际贸易中的食品，并且在这里主要描述产品的分配和各种微生物指标。分析方法和更多细节通常应参考 ICMSF 附注（16）。

[a] 正常计划和限定指标。

[b] 适当的附加试验。

19.2.3.1 各种产品的微生物标准

在HACCP和采样方案的内容完善之前，微生物标准（在那时通常作为标准）已用于各种产品。

以下列出的是食品和食品成分，它们应用的是各种机构制定的微生物标准，而这些标准又以联邦、州府以及地方的有效标准为依据（源自 W. C. Frazier，食品微生物，1968，McGraw Hill 出版公司）。

1. 淀粉和糖的标准（国家罐头制造者协会）

A. 总体嗜热芽孢数：来自大量糖或淀粉的 5 个样品中不应含有多于 150 个芽孢/10g，并且所有样品平均不应超过 125 个芽孢/10g。

B. 平酸芽孢：5 个样品中，不应含有多于 75 个芽孢/10g，并且所有样品平均不应超过 50 个芽孢/10g。

C. 嗜热厌氧芽孢：5 个样品中不应多于 3 个（60%）含有这些芽孢，并且在任何一个样品中，6 只试管中不应多于 4 个（65%）为阳性。

D. 硫化物腐败芽孢：5 个样品中不应多于 2 个（40%）含有这些芽孢，并且在任何一个样品中，不应多于 5 个菌落/10g（相当于 6 只试管中有 2 个菌落）。

2. “瓶装”砂糖标准（有效期 1953 年 7 月 1 日）（美国瓶装充气饮料）

A. 嗜中温细菌：不多于 200 个/10g。

B. 酵母：不多于 10 个/10g。

C. 霉菌：不多于 10 个/10g。

3. “瓶装”液体糖标准（1959 年内有效）（美国瓶装充气饮料）：所有数据以干糖等同物为基础（D. S. E.）。

A. 嗜中温细菌：(a) 20 个样品平均 100 个或低于 100 个/10g D. S. E.；(b) 20 个样品中有 95%含有 200 个或低于 200 个/10g；(c) 20 个样品中有一个可能超过 200 个；其它数字如 (a) 或 (b)。

B. 酵母：(a) 20 个样品平均 10 个或低于 10 个/10g D. S. E.；(b) 20 个样品中有 95%含有 18 个或低于 18 个/10g；(c) 20 个样品中有一个可能超过 18 个；其它数据如 (a) 或 (b)。

C. 霉菌：标准与酵母类似。

4. 牛乳制品标准

A. 源自 1965 年美国公众健康部门的建议。

a. 巴氏灭菌的 A 级生牛乳：在混合其他牛乳前不超过 100 000 个细菌/mL；巴氏灭菌前作为混合牛乳不超过 300 000/mL。

b. A 级巴氏灭菌牛乳和牛乳制品（不包括发酵乳制品）：不高于 20 000 个细菌/mL，并且不高于 10 个大肠菌群/mL。

c. A 级巴氏灭菌发酵乳制品：不高于 10 个大肠菌群/mL。

注：对 (a)、(b) 和 (c) 的实行要求 5 个样品中有 3 个符合标准。当 4 个连续样品中有 2 个不符合标准时，则检验第 5 个样品；如果它超过任何标准，则可能吊销健康专家批准的许可证。当 4 个连续样品符合标准后，可以重新得到许可证。

B. 特级牛乳（美国医用牛乳委员协会，股份有限公司）

a. 特级牛乳（未加工）：细菌平板数不超过 1×10^4菌落/mL；大肠菌群菌落数不超过10mL。

b. 特级牛乳（巴氏灭菌）：在巴氏灭菌前细菌平板数不超过 1×10^4 菌落/mL 并且线上样品不超过 5×10^2/mL 。在巴氏灭菌前大肠菌群菌落数不超过 10/mL 并且线上样品不超过 1 个大肠菌群菌落/mL。

C. 用于制造和加工的牛乳（美国农业局，1955）

a. 1 级：显微镜直接观察到的菌落数（DMC）不超过 2×10^5/mL。

b. 2 级：DMC 不超过 3×10^6/mL。

c. 用于制造 A 级乳粉的牛乳：必须符合巴氏灭菌的 A 级生牛乳的要求（见上述）。

D. 乳粉

a. A 级乳粉制品：标准平板菌数不超过 3×10^4/g，或大肠菌群数不超过 90/g（美国公众健康部门。

b. 农业贸易部门标准（美国农业局）：

（1）速溶脱脂：美国特级，标准平板菌数不超过 3.5×10^4/g，并且大肠菌群数不超过 90/g。

（2）脱脂（滚筒或喷雾）：美国特级，标准平板菌数不超过 5×10^4/g；美国标准级，不超过 1×10^5。

（3）脱脂（滚筒或喷雾）：显微镜直接观察菌落数不超过 20×10^8/g；并且必须满足美国标准指标要求。美国特级，如用于学校午餐的乳粉，菌数上限为 7.5×10^8/g。

c. 乳粉（国际牛乳联合会提出的微生物指标，1982）。

嗜中温菌数　$n=5$，$c=2$，$m=5\times10^4$，$M=2\times10^5$

大肠菌群　$n=5$，$c=1$，$m=10$，$M=100$

沙门氏菌　$n=15$，$c=0$，$m=0$

E. 速冻甜食

美国州政府和地方政府的细菌标准通常规定最大菌数为（5～10）$\times10^4$//mL 样品。美国公众健康条例和规定限定最大菌数为 5×10^4，并建议把奶油和牛乳作为食品成分来规定其微生物标准。很少地区对此使用大肠菌群标准。

5. 番茄汁和番茄制品标准——霉菌数的容许量（美国食品与药品管理局）

番茄汁阳性的容许量为 2%，其它碎番茄制品如番茄酱、菜泥、番茄糊等为 40%。用显微镜观察，当不多于 3 个霉菌菌丝的总长超过视野直径的 1/6 时，则认为是阳性（霍华特霉菌计数法）。这种方法也用于各种生的和冷冻水果，特别是浆果。

19.2.3.2　其他标准或指标

（1）由 ICMSF[15]所建议的 9 种产品的采样方案和微生物标准列于 表 19.5 中（计划规则或情况的解释见表 19.6）。所选的示例反映了不同的计划规则（二级和三级计划）和不同的微生物指标。

表 19.6 与健康危害程度和使用条件相关的计划规则[16]

危害类型	取样后预计要处理和消耗的食品的状况		
	降低危害程度	在危害中不引起变化	可能增加危害
非直接的健康危害			
应用（如一般染菌，有效保存期缩短和腐败）	情况 1	情况 2	情况 3
健康危害			
低等，非直接（仪器检测）	情况 4	情况 5	情况 6
中等，直接，分布有限	情况 7	情况 8	情况 9
中等，直接，潜在的扩大分布	情况 10	情况 11	情况 12
严重，直接	情况 13	情况 14	情况 15

注：资料来源 ICMSF (16)；copyright ©1986，University of Toronto Press，允许使用。

(2) 深加工去骨禽肉制品的加拿大标准见表 19.7。

表 19.7 深加工去骨禽肉制品指标[34]

试验/条件	n	c	m	M
APC（用前加热）	5	3	10^4	10^5
APC（用前蒸煮）	5	3	10^6	10^7
APC（用前在蒸汽中煮）	5	3	10^5	10^6
金黄色葡萄球菌	5	1	10^2	10^4
大肠杆菌	5	2	10	10^2

注：(1) 不允许有沙门氏菌、耶尔森氏菌或马赫藻细菌。
(2) 出处：Warburton 等人[34]。

(3) 农家干酪和冰淇淋的加拿大标准[25]
大肠菌群：$n=5$，$c=1$，$m=10$，$M=10^3$（用于农家干酪和冰淇淋）
好氧菌平板计数：$n=5$，$c=2$，$m=10^5$，$M=10^6$（仅用于冰淇淋）

(4) 熟的即食小虾的建议标准[23]
金黄色葡萄球菌：$n=5$，$c=2$，$m=50$，$M=500$
大肠菌群：$n=5$，$c=2$，$m=10^2$，$M=10^3$

(5) 熟的即食蟹肉的建议标准[23]
金黄色葡萄球菌：$n=5$，$c=2$，$m=10^2$，$M=10^3$
大肠菌群：$n=5$，$c=2$，$m=500$，$M=5000$

标准 4 和 5 中的制品对沙门氏菌和单核细胞增生李斯特氏菌都是开放的。在整个加工过程中建议使用大肠菌群标准。

参 考 文 献

[1] Adams, C. E. 1990. Use of HACCP in meat and poultry inspection. *Food Technol.* 44 (5): 169～

170.

[2] Archer, D. L. 1990. The need for flexibility in HACCP. *Food Technol.* 44 (5): 174～178.

[3] Bauman, H. 1990. HACCP: Concept, development, and application. *Food Technol.* 44 (5): 156～158.

[4] Bauman, H. E. 1974. The HACCP concept and microbiological hazard categories. *Food Technol.* 28 (9): 30～34, 74.

[5] Bryan, F. L. 1981. Hazard analysis of food service operations. *Food Technol.* 35 (2): 78～87.

[6] Bryan, F. L. 1990. Hazard analysis critical control point (HACCP) systems for retail food and restaurant operations. *J. Food protect.* 53: 978～983.

[7] Bryan, F. L. 1990. Application of HACCP to ready-to-eat chilled foods. *Food Technol.* 44 (7): 70～77.

[8] Bryan, F. L. 1988. Risks of practices, procedures and processes that lead to outbreaks of foodborne diseases. *J. Food Protect.* 51: 663～673.

[9] Codex Alimentarius Commission, 14th Session. 1981. *Report of the 17th Session of the Codex Committee on Food Hygiene.* Alinorm 81/13. Rome: Food and Agriculture Organization.

[10] Conference on Food Protection. 1971. *Proceedings.* Washington, DC: U. S. Government Printing Office.

[11] Corlett, D. A., Jr. 1991. Monitoring a HACCP system. *Cereal Foods World* 36 (1): 33～40.

[12] Corlett, D. A., Jr. 1987. Selection of microbiological criteria based on hazard analysis of food. In *Food Protection Technology, Proceedings of the 3rd Conference for Food Protection*, ed. C. W. Felix. Chelsea, MI: Lewis Publishers.

[13] Dean, K. H. 1990. HACCP and food safety in Canada. *Food Technol.* 44 (5): 172～178.

[14] Elliott, H. P., and H. D. Michener. 1961. Microbiological standards and handling codes for chilled and frozen foods: A review. *Appl. Microbiol.* 9: 452～468.

[15] Garrett, E. S., Ⅱ, and M. Hudak-Roos. 1990. Use of HACCP for seafood surveillance and certification. *Food Technol.* 44 (5): 159～165.

[16] ICMSF. 1986. *Microorganisms in Foods 2. Sampling for Microbiological Analysis: Principles and Specific Applications.* 2d ed. Toronto: University of Toronto Press.

[17] ICMSF. 1988. *Microorganisms in Foods 1. Application of the Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP) System to Ensure Microbiological Safety and Quality.* London: Blackwell.

[18] Kilsby, D. C. 1982. Sampling schemes and limits. In *Meat Microbiology*, ed. M. H. Brown, 387～421. London: Applied Science Publishers.

[19] Miskimin, D. K., K. A. Berkowitz, M. Solberg, W. E. Riha, Jr., W. C. Franke, R. L. Buchanan, and V. O'Leary. 1976. Relationships between indicator organisms and specific pathogens in potentially hazardous foods. *J. Food Sci.* 41: 1001～1006.

[20] Moberg, L. 1989. Good manufacturing practices for refrigerated foods. *J. Food Protect.* 52: 363～367.

[21] Mortimore, S., and C. Wallace. 1994. *HACCP—A Practical Approach.* New York: Chapman & Hall.

[22] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1990. *Hazard Analysis and Critical Control Point System.* Washington, DC: U. S. Department of Agriculture.

[23] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1990. *Recommendations of the*

Seafood Working Group for Cooked Ready-to-Eat Shrimp and Cooked Ready-to-Eat Crabmeat. Washington, DC: U. S. Department of Agriculture.

[24] National Conference on Food Protection. 1971. *Proceedings.* Publ. 1712～0134. Washington, DC: U. S. Government Printing Office.

[25] National Research Council (U. S. A.). 1985. *An Evaluation of the Role of Microbiological Criteria for Foods and Food Ingredients.* Washington, DC: National Academic Press.

[26] National Research Council (U. S. A.). 1969. *An Evaluation of the Salmonella Problem.* Washington, DC: National Academy of Sciences.

[27] Simonsen, B., F. L. Bryan, J. H. B. Christian, T. A. Roberts, R. B. Tompkin, and J. H. Silliker. 1987. Prevention and control of food-borne salmonellosis through application of Hazard Analysis Critical Control Point (HACCP). *Int. J. Food Microbiol.* 4: 227～247.

[28] Sperber, W. H. 1991. The modern HACCP system. *Food Technol.* 45 (6): 116～120.

[29] Solberg, M., J. J. Buckalew, C. M. Chen, D. W. Schaffner, K. O'Neill, J. McDowell, L. S. Post, and M. Boderck. 1990. Microbiological safety assurance system for foodservice facilities. *Food Technol.* 44 (12): 68～73.

[30] Solberg, M., D. K. Miskimin, B. A. Martin, G. Page, S. Goldner, and M. Libfeld. 1977. Indicator organisms, foodborne pathogens and food safety. *Assoc. Food Drug. Off. Quart. Bull.* 41 (1): 9～21.

[31] Stevenson, K. E. 1990. Imp lementing HACCP in the food industry. *Food Technol.* 44 (5): 179～180.

[32] Todd, E. C. D. 1989. Foodborne and waterborne disease in Canada 1984: Annual summay. *J. Food Protect.* 52: 503～511.

[33] Tompkin, R. B. 1990. The use of HACCP in the production of meat and poultry products. *J. Food Protect.* 53: 795～803.

[34] Warburton, D. W., K. F. Weiss, G. Lachapelle, and D. Dragon. 1988. The microbiological quality of further processed deboned poultry products sold in Canada. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21: 84～89.

第七部分　食物传染的疾病

多数起因于食物的人类疾病将在本部分中讨论。对于每一种或多种由食物传播的病原菌，文中将着重介绍它们各自的生态、媒介食物、发病机理和症状及疾病的防治方法。某些已知的动物寄生虫及它们可能经过食品的传播方式将在本部分 27 中介绍。这些病原菌中的多数在过去还没有被食品微生物学家们研究过，这是一个将来值得重视的领域。关于每一种病症的已知症状已经不属于本书的范畴，读者如果需要了解更详细的信息，可以参考下述一些参考文献。

Cliver，D. O.，ed.，*Foodborne Diseases*（New York. Academic Press，1990）。这是一本优秀的著作，但在食物的疾病方面的内容没有 Doyle 的著作中有详细介绍。

Doyle，M. P.，ed.，*Foodborne Bacterial Pathogens*（New York. Marcel Dekker，1989）。所有已知的和多数有所研究的来源于食物的病原菌在书中都有较详细的介绍。

Hauschild，A. H. W. and K. L. Dodds，eds. 1992. *Clostridium botulinum：Ecology and Control in Foods*. New York. Marcel Dekker，Inc. 是关于食品微生物领域最近的一部专著。

Hui，Y. H.，J. P，Gorham，K. D. Murrell，and D. O. Cliver，eds. 1994. *Foodborne Disease Handbook Diseases Caused by Bacteria*. New York：Marcel Dekker，Inc. 书中共分 13 章，讨论了包含布鲁菌在内的食物传染的疾病的病原菌，书中还介绍了食物传染的疾病的监测方法、调查方法和指标微生物。

Ryser，E. T.，and E. H. Marth，*Listeria，Listeriosis，and Food Safety*（New York. Marcel Dekker，1991）。是关于该主题上一本最详尽的书，书中还介绍了食品中李斯特菌的研究方法。

Sears，C. L. and J. B. Kaper. 1996. *Enteric bacterial toxins：Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion*. Microbial. Rev. 60：167～215. 是一篇关于所论主题的最新综述，引用了 558 份参考文献。文中介绍了几乎所有来源于食品病原微生物的毒素。

Sharma，R. P.，and D. K. Salunkhe，*Mycotoxins and Phytoalexins*（Boca Raton，FL：CRC Press，1991）。详细介绍了黄曲霉毒素和其他真菌毒素。

20. 葡萄球菌胃肠炎

葡萄球菌食物中毒综合症首先由 J. Denys 在 1894 年进行了研究，后来在 1914 年由

Barber 又进行了研究。Barber 自己饮用了经过金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)培养物感染的牛乳，并研究了自己患病过程的各种症状。G. M. Dack 等人证实了金黄色葡萄球菌的某些菌株有导致食物中毒的能力[24]，他们证明金黄色葡萄球菌培养物的滤液也能导致同样的症状。虽然某些研究者将这种与食品有关的疾病类型称为食物毒素中毒而不是细菌感染，但简称“胃肠炎”则回避了这类疾病是中毒还是感染的问题。

葡萄球菌胃肠炎是由于摄入含有一种或多种肠毒素的食物所引起的。这些肠毒素只能由葡萄球菌的某些菌种和菌株产生。虽然一般认为这类肠毒素的产生与产生凝固酶和核酸酶（耐热核酸酶）的金黄色葡萄球菌有关，但目前已经知道许多既不产生凝固酶的也不产生耐热核酸酶的葡萄球菌也能产生肠毒素（见下述）。

关于论述葡萄球菌和食物中毒症状的著作很多，这些内容的大部分已经超出本部分的范畴。

20.1 食物中有关的菌种

1996 年初，已经归类于葡萄球菌属（*Staphylococcus*）的菌种有 31 种，其中与食物有关的菌种列在表 20.1 中。在表中列出的 18 个种和亚种中，仅有 6 种为凝固酶阳性，它们一般会产生耐热核酸酶（TN 酶）。在凝固酶阴性菌种中，有 10 种能产生肠毒素，但不产生核酸酶，或者产生不耐热核酸酶。产生肠毒素的凝固酶阴性菌株在产生溶血素或发酵甘露醇方面的能力并不一致。凝固酶阳性葡萄球菌是与食物有关的重要菌种，在食物检测的长期实践中无疑低估了它们在肠毒素产生方面的主要作用。

表 20.1　已知能产生凝固酶、核酸酶和/或肠毒素的葡萄球菌菌种和亚种

菌种	拉丁名称	凝固酶	核酸酶	肠毒素	溶血性	甘露醇	DNA 中 (G+C)%
金黄色葡萄球菌	*S. aureus subsp.*						
厌氧亚种	*anaerobius*	−	耐热	−	+	−	31.7
金黄亚种	*aureus*	+	耐热	+	+	+	32～36
间型葡萄球菌	*S. intermedius*	+	耐热	+	−	(+)	32～36
猪葡萄球菌	*S. hyicus*	(+)	耐热	−		−	33～34
海豚葡萄球菌	*S. delphini*	+	−		+	−	39
施氏葡萄球菌	*S. schleiferi* subsp.						
凝聚亚种	*coagulans*	+	耐热		+	(+)	35～37
施氏亚种	*schleiferi*	+	耐热		+	+	37
山羊葡萄球菌	*S. caprae*		不耐热	+	(+)	−	36.1
产色葡萄球菌	*S. chromogens*	−	−w	+	−	可变	33～34
柯氏葡萄球菌	*S. kloosii*	+	−	+		可变	36～38
表皮葡萄球菌	*S. epidermidis*	+	−	+	可变	+	30～37

续表

菌种	拉丁名称	凝固酶	核酸酶	肠毒素	溶血性	甘露醇	DNA 中 (G+C)%
溶血葡萄球菌	*S. haemolyticus*	−	不耐热	+	+	可变	34～36
缓慢葡萄球菌	*S. lentus*	−		+	−	+	30～36
腐生葡萄球菌	*S. saprophyticus*	−	−	+	−	+	31～36
松鼠葡萄球菌	*S. sciuri*	−		+	−	+	30～36
模仿葡萄球菌	*S. simulans*	−	可变		可变	+	34～38
沃氏葡萄球菌	*S. warneri*	−	不耐热	+	−W	+	34～35
木糖葡萄球菌	*S. xylosus*	−	−	+	+	可变	30～36

注：+为阳性；−为阴性；−W 为阴性至弱阳性；(+)为弱阳性。

葡萄球菌中产生耐热核酸酶和凝固酶的关系已在第四部分 11 中讨论。但是一般推测当食品中发现葡萄球菌时，只有耐热核酸酶和凝固酶阳性菌株值得进一步调查，但是能产生耐热核酸酶和凝固酶阴性的菌株有时也能产生肠毒素。

在凝固酶阳性的菌种中，间型葡萄球菌(*S. intermedius*)是著名的肠毒素产生菌。这种菌被发现存在于食肉动物和马的鼻腔内及皮肤上，但是很少 在人体中被发现。它们是著名的狗病原菌。从巴西患热皮炎的狗体上，发现了 73 株葡萄球菌，其中 52 株是间型葡萄球菌[43]。上述 52 株菌在兔血浆中都呈现凝固酶阳性，但在人血浆中都呈现凝固酶阴性，其中 13 株(25%)是肠毒素产生菌。4 株菌产生 D 型葡萄球菌肠毒素(SED)，5 株菌产生 E 型葡萄球菌肠毒素(SEE)，产生 SEB、SEC、SED/E 和 SEA/C 的菌株各有 1 种 。这 13 株菌都是耐热核酸酶阳性，其中有 3 株能产生导致中毒休克症状的毒素(TSST)。许多猪葡萄球菌(*S. hyicus*)菌株是凝固酶阳性菌株，其中一些菌株似乎也能产生肠毒素。在一份研究中，一些猪葡萄球菌菌株在猕猴中引起了肠毒素阳性反应，但这些肠毒素都不属于已知的 A 型至 E 型[3,45]。在另一份对于羊体内分离菌株的研究中，猪葡萄球菌的 6 株凝固酶阳性菌株中有 2 株产生了 SEC[98]。海豚葡萄球菌(*S. delphini*)、溶血性葡萄球菌(*S. simulans*)和施氏葡萄球菌凝聚亚种(*S. schleiferi* subsp. *coagulans*)还未见能产生肠毒素的报道。

表 20.1 中的凝固酶阴性葡萄球菌至少有 10 种能产生肠毒素。柯氏葡萄球菌、表皮葡萄球菌、溶血葡萄球菌、木糖葡萄球菌和金黄色葡萄球菌一起被从羊乳中分离出来[6]。柯氏葡萄球菌的 1 株分离物产生了肠毒素 C，表皮葡萄球菌的 3 株菌产生了肠毒素 C 和肠毒素 B/C/D (2 株菌)，溶血葡萄球菌的 5 株菌产生了 SEA，SED，SEB/C/D 和 SEC/D (2 株菌)，而木糖葡萄球菌的 4 株菌都产生了 SED[6]。这些研究者注意到，甘露醇发酵是区分肠毒素阳性和肠毒素阴性菌株的最好方法。在另一份研究中，从食品中分离出的 20 株凝固酶阴性菌株中有 1 株被发现是溶血葡萄球菌的肠毒素产生菌株，它能产生 SEC 和 SED[30]。在一份对于来源于健康羊体内葡萄球菌的研究中，70 株凝固酶阳性菌株中有 74.3%产生了肠毒素，272 株凝固酶阴性菌株中有 22%是肠毒素阳性[98]。SEC 是山羊体内分离物中最常见的肠毒素。山羊体内分离物中有 7 种菌 (山羊葡萄球菌、表皮葡

萄球菌、溶血葡萄球菌、腐生葡萄球菌、松鼠葡萄球菌、沃氏葡萄球菌和木糖葡萄球菌）能产生1种以上的肠毒素，有两种菌只能各产生1种肠毒素——产色葡萄球菌产生肠毒素C，缓慢葡萄球菌产生肠毒素E[98]。从煮熟的螃蟹肉中被鉴定出的葡萄球菌竟然有100株之多：缓慢葡萄球菌31株，人葡萄球菌21株，表皮葡萄球菌10株，克氏葡萄球菌8株，头状葡萄球菌5株，金黄色葡萄球菌、腐生葡萄球菌和松鼠葡萄球菌各3株[27]，另外5种菌被发现的菌株都在3株以下。从西班牙的干腌火腿中，人们分离出了产生肠毒素C的表皮葡萄球菌[63]。

20.2 生态和分布

葡萄球菌适应于温热的环境，在已知的菌种中约有一半只寄生在人体内（例如柯氏葡萄球菌柯氏亚种），或寄生在人体和其它动物体内（例如金黄色葡萄球菌）。它们多数被发现在靠近出入口处的身体表面，例如鼻腔前端、腋窝、腹股沟和会阴等处，这些地方潮湿时，菌数可以达到10^5～$10^6/cm^2$，而干燥时，可能达到10～$10^3/cm^2$[59]。食品中葡萄球菌有两个重要的来源，一个是鼻腔带菌者，另一个是被容许加工食品的手或手臂上长有疖子或痈的人。

多数驯养的动物携带有金黄色葡萄球菌。葡萄球菌乳腺炎在产乳动物群中也并不罕见，如果饮用感染的牛所产的乳，或将这种牛乳用于干酪制造，导致食物中毒的机会就会较多。这些能导致牛乳腺炎的许多菌株来源于人类。但是它们其中有些菌株被定义为"动物型菌株"。在一份研究中，从部分原肉制品中分离的葡萄球菌基本都属于动物型菌株，而在将这些肉用于腌肉制品的生产过程中时，动物型菌株逐渐被人类型菌株所取代，结果在产品的成品中检测不出原有的动物型菌株[85]。

关于某些非金黄色葡萄球菌的菌种，柯氏葡萄球菌也发现存在于人体皮肤上，偶尔也发现于尿道或感染的伤口中。人体皮肤是表皮葡萄球菌和腐生葡萄球菌的栖息场所，这后者与人体的感染有关。猪葡萄球菌被发现在猪皮肤上，有时能导致皮肤感染，这种菌也被发现存在于乳品和家禽体上。较低等灵长类动物和其它哺乳动物的皮肤是母木糖葡萄球菌的栖息地，人类和其它灵长类动物的皮肤是模仿葡萄球菌的栖息场所。施氏葡萄球菌施氏亚种被发现于对感染抵抗力降低的患者的临床样品中[32]，凝聚亚种在感染的狗耳朵中被分离出来。金黄色葡萄球菌厌氧亚种能导致羊患病，而海豚葡萄球菌被从海豚体内分离了出来[100]。松鼠葡萄球菌在啮齿类动物皮肤上被发现，缓慢葡萄球菌和山羊葡萄球菌与山羊有关，尤其是与山羊乳有关。

虽然上述许多凝固酶阴性菌种主要适应于非人类寄主，但不能排除它们可能进入人类食品的可能性。一旦感染食品之后，它们很可能会产生肠毒素。上述这些菌种都能在10% NaCl存在的环境中生长。

在葡萄球菌中，因为金黄色葡萄球菌是食物起因胃肠炎的病原菌而被研究得最为深入，所以下述信息主要是关于这种菌的研究成果。

20.3 食物中的发生率

一般来说，除了加热过程能将它们全部杀死之外，葡萄球菌在任何或所有来源于动物原料或直接由人体接触方式加工的食品产品中是存在的，至少少量存在。许多研究者发现它们在食品商品中大量存在（关于食品中所发现的金黄色葡萄球菌的数量可以参阅第三部分 4～6）。

20.4 生长的营养需求

葡萄球菌是其它革兰氏阳性菌的典型菌种，需要某些有机化合物作为营养物。氨基酸是所需的氮源，硫胺素和烟酸是所需要的B族维生素。在厌氧条件下生长时，它们似乎还需要尿嘧啶。在一种好氧培养和产生肠毒素的最低要求的培养基中，谷氨酸钠可以作为碳源、氮源和能源。在这种培养基中，除了无机盐之外，只含有3种氨基酸（精氨酸、胱氨酸和苯丙氨酸）和4种维生素（泛酸、生物素、烟酸和硫胺素）[67]。精氨酸对于肠毒素B的生成似乎是必须的[102]。

20.5 生长温度范围

虽然金黄色葡萄球菌是嗜温细菌，但它们能在6.7℃的低温下生长[4]。这些研究者发现的3株导致食物中毒的菌株能在45.6℃的蛋奶甜羹中生长，但温度上升到46.7～48.9℃时的培养时间缩短。它们能在44.4℃下的鸡肉中生长，但在同样温度下不能在火腿沙拉中生长。一般来说，葡萄球菌生长的温度范围为7～47.8℃，肠毒素是在10～46℃范围内产生的，其最佳的生长温度为40～45℃[88]。上述生长和产生毒素的最高和最低温度是与其它因素有关的极端条件，这些因素与温度的相互关系详见下述。

20.6 食盐和其它化学剂的影响

虽然金黄色葡萄球菌能够在不含NaCl的培养基中良好地生长，但它们能在NaCl含量为7%～10%的情况下生长，某些菌株甚至能在20% NaCl的环境中生长。容许生长的最高浓度与其它因素有关，例如温度、pH、水分活度（A_w）和氧化还原电位（Eh）等（见下述）。

金黄色葡萄球菌对于亚碲酸盐、氯化汞、新霉素、多黏菌素和叠氮化钠之类的化合物具有很强的抗性，这些都是用在培养基种的筛选试剂。金黄色葡萄球菌对吖啶黄素有很强的抗性，根据这一点可以区分它与其它葡萄球菌。在硼酸盐存在时，比较敏感，而表皮葡萄球菌（*S. epidermidis*）具有抗性[55]。当新生霉素存在时，腐生葡萄球菌具有抗性，而金黄色葡萄球菌和表皮葡萄球菌没有抗性。当微球菌（*Micrococcus*）和柯寇里菌（*Kocuria*）共同存在时，它们对某些其它化合物具有高度的抗性，这些菌在自然界和食品

中一般比葡萄球菌的数量要大得多，从而使得葡萄球菌的分离较为困难。其它化学剂对金黄色葡萄球菌的作用将在第五部分 13 中讨论。

20.7 pH、水分活度和其它参数的影响

金黄色葡萄球菌可以在 pH4.0～9.8 范围内生长，但它的最适生长 pH 范围在 6～7。如同其它生长参数一样，生长最低 pH 的精确值取决于其它参数的影响程度。在家制的蛋黄酱中，当初始 pH 低至 5.15 和最终生长 pH 不低于 4.7 时，就会产生肠素素[40]。当接种量约为 10^5/g 时，肠毒素 B 的产生水平为 158ng/100g。一般来说，肠毒素 A 的产生比肠毒素 B 的产生对 pH 的敏感度要低。带有缓冲能力的 pH 为 7.0 的培养基比无缓冲能力的或酸性范围的缓冲培养基能够导致产生较多的肠毒素 B[65]。控制 pH 在 6.5 而不是在 7.0 也获得了类似的结果[54]。

关于水分活度（A_w），葡萄球菌能够生长在 A_w 低于其它任何非嗜盐细菌能够生长的水平，这是葡萄球菌具有的特征。在其它条件比较理想时，可以证实葡萄球菌能在 A_w 低达 0.83 的情况下生长，但一般认为 A_w 为 0.86 是它生长所需的最低水分活度。

20.7.1 NaCl 和 pH

用蛋白质水解液在 37℃温度下培养 8d，当 pH 范围在 4.00～9.83 而不加 NaCl 时，金黄色葡萄球菌可以生长并产生肠毒素 C。当添加 4% NaCl 时，如果将 pH 范围限制在 4.4～9.43，也会产生肠毒素 C（表 20.2）。当 NaCl 达到 10%和 pH 在 5.45 或更高时，还会产生毒素，但 NaCl 高达 12%时则不产生毒素[34]。

表 20.2 pH 和 NaCl 对于金黄色葡萄球菌 137 的生长和肠毒素 C 生成的影响

（在蛋白质水解液培养基中，接种量 10^8/mL，培养温度 37℃）

	pH				
	4.00～9.83	4.4～9.43	4.50～8.55	5.45～7.30	4.50～8.50
NaCl 含量/%	0	4	8	10[a]	12
肠毒素生成	+	−	+	+	−

注：资料来源 Genigeorgis et al.[34]；copyright ©1971 by American Society for Microbiology。

[a] 在接种量 3.6×10^6 和 pH6.38～7.30 条件下也检测到了肠毒素。

在 pH4.8 和 5% NaCl 条件下，金黄色葡萄球菌的生长受到抑制。在 10% NaCl 和 pH6.9 条件下，S-6 菌株仍能生长，并产生肠毒素 B，而在 4% NaCl 和 pH5.1 条件下则不能生长[36]。增加 NaCl 浓度的总效应是提高了生长的 pH。在 pH7.0 和 37℃温度下，肠毒素 B 的生成被 6%和更高浓度的 NaCl 所抑制（图 20.1）。

20.7.2 pH、水分活度和温度

在含有 NaCl 和蔗糖作为润湿剂的脑心浸出汁培养液（BHI）中，金黄色葡萄球菌混

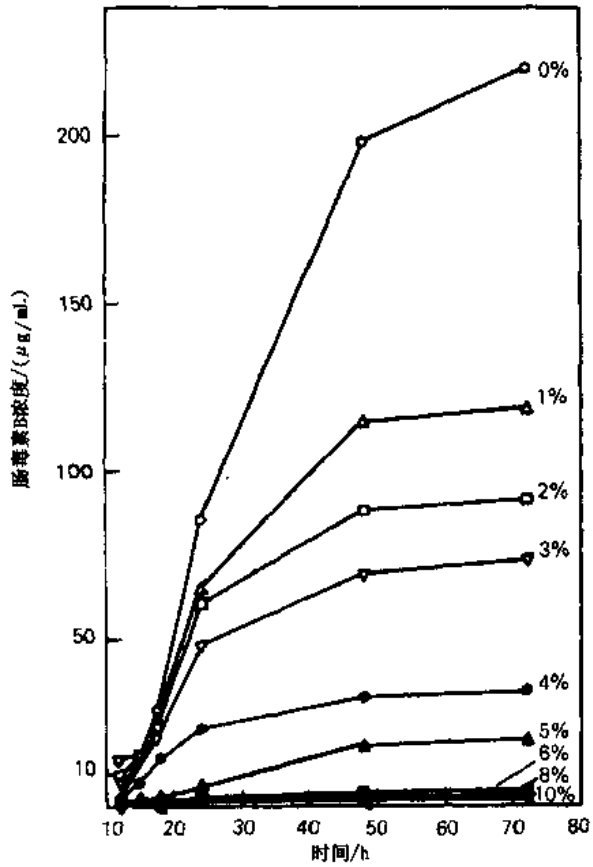


图 20.1　在 4%NZ-Amine NAK 培养基中不同氯化钠浓度（pH7.0 和 37℃时）葡萄球菌肠毒素 B 的生成情况

注：资料来源 Pereira et al.[77]，copyright ©1982 by International Association of Milk，Food and Environmental Sanitarians。

合菌株在 pH4.3、A_w0.85 或 8℃条件下都不能生长。在 pH＜5.5，12℃和 A_w 0.90 或 0.93 条件下金黄色葡萄球菌不能生长，在 pH＜4.9，12℃和 A_w 0.96 该菌也不能生长[72]。

20.7.3　$NaNO_2$、Eh、pH 和生长温度

在厌氧条件下，当盐含量达到 9.2%，pH 不低于 5.30，温度 30℃，或 pH 5.58 和 10℃时，金黄色葡萄球菌 S-6 菌株能在腌制的火腿中生长和产生肠毒素 B。在好氧条件下，产生肠毒素的时间比在厌氧条件下早。随着 HNO_2 浓度的增加，肠毒素的生成量减少[35]。

20.8　葡萄球菌肠毒素：类型和发生率

现在已经鉴定出的葡萄球菌肠毒素有 9 种，其中最后 2 种是在 1992 年和 1994 年鉴定出来的。人们并没有鉴定出肠毒素 G 蛋白质本身，而是在 1992 年报道了这种毒素的

基因编码[14]。肠毒素 H 是在 1994 年鉴定出来的[92]。到目前为止，还没有肠毒素 G 大量存在于食物中的报道。下述信息包括肠毒素 A、B、C_1、C_2、C_3、D、E 和 H。肠毒素 C_3 在化学结构和血清学上与肠毒素 C_1 和 C_2 相关，但并不完全一致[81]。能与每一种肠毒素 C 反应的抗体之间也有相互的交叉反应，但它们的抗原性质稍有不同。肠毒素 C_3 与 C_1 的核苷顺序有 98%相同[21]，而肠毒素 C 与 B 之间只有 68%相同。肠毒素 A 与 E 之间有交叉反应，肠毒素 B 的某些抗体与各种肠毒素 C 之间也有交叉反应[13]。现在证明，在 20 世纪 80 年代早期被认为是肠毒素的物质是中毒性休克综合征毒素（TSST）。某些产生肠毒素的菌株也能产生 TSST，有些中毒性休克综合征似乎是由肠毒素 A、B 和 C_1 引起的。肠毒素 A、B、C_1 和 E 的基因位于染色体上，而肠毒素 D 的基因位于细胞质中[50]。

某些肠毒素的发生率概括在表 20.3 中。一般来说，在食物中毒发生时，肠毒素 A 是最常见的毒素，肠毒素 D 的发生率其次，涉及到肠毒素 E 的发病率最低。根据大量调查者的统计结果，在不同来源的 3190 和 1055 个菌株中，肠毒素 A 和 D 的发生率分别为 23%和 14%[90]。在所调查的 3367、1581 和 1072 个菌株中，肠毒素 B、肠毒素 C 和肠毒素 E 的发生率分别为 11%、10%和 3%。

表 20.3　葡萄球菌肠毒素单独产生和混合产生的发生率　　单位：%

来源	样品数/个	肠毒素发生率	肠毒素发生率					参考文献
			A	B	C	D	E	
人体样品	582	·	54.5	28.1	8.4	41.0		18
原乳	236	10	1.8	0.8	1.2	6.8		18
冷冻食品	260	30	3.4	3.0	7.4	10.4	—	18
食物中毒者	80	96.2	77.8	10.0	7.4	37.5		18
食品	200	62.5	47.5	3.5	12.0	18.5	6.5	77
家禽	139	25.2	1.4	0	0.7	23.7	0	42
人体	293	39	7.8	17.7	7.2	6.8	0.7	75
家禽	55	62	60.0	1.8	3.6	0	0	38
西班牙干腌火腿	135	85.9	54.3	2.6	10.3	—		63
比利时和扎伊尔的样品	285	16.2	6.5	4.5	2.7	0.5	·	52
特立尼达原乳	230	40.4[a]	7.5	9.7	34.4	8.6		1

[a] 包括混合产生的发生率。

不同来源的各种菌株中的肠毒素的相对发生率差别很大。在来源于美国的人体样品的分离菌株中，50%以上能单独或混合分泌肠毒素 A[19]，而从斯里兰卡的人体样分离物中，肠毒素 A 的产生菌只占 7.8%[75]。与其它文献报道不同的是，后一组研究者发现肠毒素 B 的产生菌多于任何其它毒素的产生菌。在食品中分离的金黄色葡萄球菌菌株之间也有很大的差别。在一份研究中，Harvey 等人发现肠毒素 D 与家禽菌株的关系比与人类菌株的关系更为密切[42]，而在另一份研究中，这些研究者在 55 份家禽分离物中没有发现肠毒素 D[38]。在另外一份研究中，在 3 株非典型的分离菌株（凝固酶发酵缓慢、弱阳性或阴性，甘露醇厌氧发酵阴性）中，有 2 株产生了[28]。这些菌株是从家禽中分离出来的。在尼日利亚的熟食制品中，所分离的 248 株菌约有 39%是肠毒素产生菌，其中有 44%产生肠毒

素 D[2]。在来源于尼日利亚的多种食品中，所分离的 449 株金黄色葡萄球菌凝固酶阳性菌株的肠毒素 A、肠毒素 B、肠毒素 D 和肠毒素 C 的发生率分别为 57%、15%、6%和 5%[89]。在来源于羊乳的 124 株菌(包括 4 株凝固酶阴性菌)中的肠毒素 A 和肠毒素 D 的发生率均为 35%[6]。在来源于乳品的 48 株菌和肉制品的 134 株菌中，肠毒素产生菌分别为 46%和 49%[77]，而在食物中毒人群中分离的 80 株菌中，有 96%产生肠毒素 A[19]。从健康山羊中分离出的 342 株凝固酶阳性和凝固酶阴性菌株中，有 67.9%产生了肠毒素 C[98]。在 133 只健康山羊中，有 17 只羊的羊乳中检出了肠毒素 A、肠毒素 B、和肠毒素 C[98]。

在一份最近对于金黄色葡萄球菌产生肠毒素 H 菌株的研究中，有 21 株菌能导致猴子出现呕吐症状，它们不产生肠毒素 A 至肠毒素 F，但其中有 10 株菌能产生肠毒素 H，其产生水平为 13～230ng/mL[91]。当对另外一组已知至少能产生 1 种肠毒素的 20 株菌进行肠毒素 H 的产生能力检测时，有 1 株肠毒素 C 产生菌产生了 142ng/mL 肠毒素 H，2 株肠毒素 D 产生菌分别产生了 52 和 164ng/mL 肠毒素 H[91]。最近发展了一种检测肠毒素 H 的方法，称为“ELISA 法”，它的最低检测浓度约为 2.5ng/mL。

不论肠毒素产生菌的产生率有多高，不同来源的分离物中其产生率的差别是很大的。在 236 份原乳分离物中只有 10%是产生肠毒素的[19]，而在 200 份食品分离物中有 62.5%呈阳性[77]。在一份对来源于鸡肝的金黄色葡萄球菌的研究中，有 40%是产生肠毒素的菌株[37]。在另一份对于 36 份食品样品分离物的研究中，有 33%是产生肠毒素的[87]。在探索葡萄球菌产生肠毒素与其它化学物质有关特性关系的研究方面，例如果胶酯酶、磷酸酯酶、裂解酶、卵磷脂酶、脂肪酶和 DNA 酶的产生能力，或不同碳水化合物的发酵能力方面的研究方面，还未获得成功。在这些方而，肠毒素产生菌似乎与其它凝固酶阳性菌有类似之处。在探索肠毒素产生能力与特定噬菌体类型之间的关系方面的研究也未获得成功。多数肠毒素产生菌属于噬菌体组Ⅲ，但是现在已知所有的噬菌体组内都有产毒菌株。从临床样品中分离的 54 株菌分别属于噬菌体组Ⅰ、Ⅱ和Ⅲ，它们分别有 5.5%、1.9%和 27.8%能产生肠毒素 A，其中有 20.4%的菌株还不能归类[18]。在从家禽分离的分离物中，有 49%的菌株还不能进行噬菌体组型分类[18]。在一份对于从肉类加工厂的工人、兽医学生和工厂设备，以及肉和肉源动物分离的 452 株菌的研究中，有 29.6%的菌株无法归类，在可以归类的菌株中，有 22.5%属于噬菌体组Ⅲ[53]，在特立尼达的 230 份分离物中，有 50.2%可以进行归类，在可归类的菌株中有 23.6%和 9.8%分别属于噬菌体组Ⅰ和Ⅲ[1]。

20.8.1 肠毒素的化学和物理特性

有关肠毒素的化学和物理特性概括在表 20.4 中。这些肠毒素都是简单蛋白质，它们水解后 能释放出 18 种氨基酸，其中天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸和酪氨酸的含量最高。肠毒素 B 的氨基酸顺序最先被确定[46]。它的 N-端是谷氨酸，C-端是赖氨酸。肠毒素 A、肠毒素 B 和肠毒素 E 由 239～296 个氨基酸残基组成。肠毒素 C_3 由 236 个氨基酸残基组成，N-端是丝氨酸、而肠毒素 C_1 的 N-端是谷氨酸[81]。在活性状态下，肠毒素对于蛋白水解酶（例如胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶、凝乳酶和木瓜蛋白酶）具有抗性，但在 pH 约为 2 的

条件下对胃蛋白酶敏感[115]。虽然不同的肠毒素在某些物理化学特性方面是不同的，但它们都具有同样的毒性力。虽然肠毒素的生物活性和血清反应一般是相关的，但也有证据表明血清反应阴性的肠毒素也具有生物活性（见下述）。

表 20.4　　金黄色葡萄球菌肠毒素的特性

物化特性	肠毒素								
	A	B	C_1	C_2	C_3	D	E	G	H
催吐剂量（ED_{50}）/（μg/只）（猴）	5	5	5	5～10	<10[a]	20	10～20		<30
含氮量/%	16.5	16.10	16.2	16.0	—	—	—		
沉降系数（$S^{\circ}_{20,w}$）/S	3.04	2.89 2.78	3.00	2.90	—	—	2.60		
扩散系数（$D^{\circ}_{20,w}$）/（$\times10^{-7}cm^2/s$）	7.94	7.72 8.22	8.10	8.10					
对比黏度（mL/g）	4.07	3.92 3.81	3.4	3.7	—	—	—		
相对分子质量	27 800	28 366	34 100	34 000	26 900	27 300	29 600		28 500
微分比体积	0.726	0.743 0.726	0.732	0.742	—	-			
等电点	6.8	8.60	8.6	7.0	8.15	7.4	7.0		5.7
最大吸收峰/nm	277	277	277	277	—	278	277		
消光值（E_{1cm}）	11.3	14.00 14.40	12.1	12.1	—	10.8	12.5		
鉴定年份	1960	1959	1967	1967	1965	1967	1971	1992	1994

[a] 静脉注射 0.05μg/kg[81]。

葡萄球菌的肠毒素是相当耐热的。肠毒素 B 在 pH 7.3 条件下于 60℃加热 16h 后仍能保持其生物活性[84]。一份肠毒素 C 制品在 60℃下加热 10min 后，其血清反应性质没有变化[157]。在 80℃加热 3min 或在 100℃加热 1min 后，肠毒素 A 的血清反应性质就会丧失[1,7]。在磷酸盐缓冲液中，肠毒素 C 比肠毒素 A 或肠毒素 B 更为耐热。这 3 种肠毒素的耐热能力依次为：肠毒素 C>肠毒素 B>肠毒素 A[96]。

在对猫的催吐反应试验中[76]，肠毒素 A 在 121℃下的热变性时间为 11min（记为 $F^{16}_{121}=11$min）。当用猴做试验时，热变性的时间为：$F^{45}_{121}=8$min。这些肠毒素制品是采用 196-E 菌株在含有 13.5 倍浓度的酪蛋白氨基酸培养液中培养后，再经过滤制成的。采用双向凝胶扩散法分析，Read 和 Bradshaw[80]发现，99%的纯肠毒素 B 在佛罗拿缓冲液中的热变性时间为 $F^{58}_{121}=16.4$min。用凝胶扩散法分析的变性终点与猫静脉注射的分析结果是一致的。用牛肉汁在 pH6.2 条件下采用 3 种不同的毒素浓度（5、17 和 60μg/mL）试验时，肠毒素 A 热致变性曲线的斜率在 27.8℃左右[25]。肠毒素 B 某些热致变性 D 值总结在表 20.5 中。据发现，肠毒素粗制品的耐热性要比纯毒素的耐热性强[80]。从表 20.5 中可以看出，葡萄球菌耐热核酸酶显示的耐热性与肠毒素 B 相似（关于这种酶的更详细信息请参阅第四部分 11）。在一项研究中，发现肠毒素 B 在 80℃比在 100℃或 110℃对热更为敏感[84]。当在有肉类蛋白质存在的情况下进行试验时，80℃下的热致变性比在 60℃或 100℃下更为明显。在经过热处理之后，婴儿罐头食品中的肠毒素 A 和肠毒素 D 不能呈现

免疫反应，但是当注射到小猫体内时仍然具有生物活性[9]。

表 20.5　　葡萄球菌肠毒素 B 和葡萄球菌耐热核酸酶热致死的 D 值

条　　件	D 值/min
Veronal 缓冲液	$D_{110℃}=29.7^a$
Veronal 缓冲液	$D_{110℃}=23.5^b$
Veronal 缓冲液	$D_{121℃}=11.4^a$
Veronal 缓冲液	$D_{121℃}=9.9^b$
Veronal 缓冲液，pH7.4	$D_{111℃}=18$
牛肉汁，pH7.4	$D_{110℃}=60$
葡萄球菌核酸酶	$D_{130℃}=16.5$

[a] 毒素粗制品；

[b] 99+%纯品。

金黄色葡萄球菌比肠毒素对热更为敏感，这一点可以从表 20.6 中不同的加热方式 D 值上得出结论。在 pH7.2 的 Ringer 溶液中，这种菌的细胞对热相当敏感（$D_{60℃}=0.11$min），而在 pH6.9 的牛乳中的耐热性要强得多（$D_{60℃}=10.0$min）。在法兰克福香肠中，加热至 71.1℃可以杀死数株金黄色葡萄球菌[76]，而微波加热 2min 可以杀死 200 万个/g 以上的细胞[101]。

表 20.6　　在不同的加热环境中金黄色葡萄球菌 196E 的热致死 D 值和 Z 值（加热温度 60 ℃）

产　　品	D 值/min	Z 值/min	参考文献
鸡肉汁	5.37	10.5	5
冰奶油	7.82	10.5	5
青豆汁	6.7～6.9	8.1	94
脱脂乳	3.1～3.4	9.2	94
0.5%NaCl	2.2～2.5	10.3	94
牛肉汁	2.2～2.6	10.5	94
脱脂乳	5.34		57
脱脂乳＋10%糖	4.11		57
脱脂乳＋25%糖	6.71		57
脱脂乳＋45%糖	15.08		57
脱脂乳＋6%脂肪	4.27		57
脱脂乳＋10%脂肪	4.20		57
Tris 缓冲液，pH7.2	2.0		49
Tris 缓冲液，pH7.2，5.8%NaCl 或 5%谷氨酸钠	7.0		49
Tris 缓冲液，pH7.2，5.8%NaCl+5%谷氨酸钠	15.5		49

当金黄色葡萄球菌菌株 MF31 细胞培养在含有大豆酱油和谷氨酸钠的心脏浸出液中时，细胞的最高生长温度和耐热性有所变化。当心脏浸出液中不含这些成分时，最高生长温度为 44℃，但含有这些成分时，最高生长温度可达 46℃以上[49]。谷氨酸钠最有意义的影响是对 $D_{60℃}$ 值的影响，这是在 pH7.2 的 Tris 缓冲液中测定的。当细胞生长在 37℃

时，Tris 缓冲液中平均 $D_{60℃}$ 值为 2.0min，但在 Tris 缓冲液中添加 5%谷氨酸钠和 5% NaCl 时，$D_{60℃}$ 值达到 15.5min。当温度升高至 46℃时，Tris 缓冲液中和 Tris 缓冲液-谷氨酸钠-NaCl 中相应的 $D_{60℃}$ 值分别为 7.75 和 53.0min。众所周知，提高培养温度可以增加菌体的耐热体，但是对于营养细胞这种耐热性的增加是有限的。

20.8.2 毒素的产生

一般来说，在 pH、温度、氧化还原电位等条件都是在菌体生长最佳条件下对肠毒素产生较为有利。现在已经证实，葡萄球菌能够在并不利于产生肠毒素的条件下生长。

关于水分活度（A_w）方面，产生肠毒素的 A_w 范围比菌体生长的 A_w 范围要稍微窄一些（肠毒素 A 除外）。在预先蒸熟的咸肉中于 37℃下培养时，金黄色葡萄球菌 A100 能够在 A_w 低达 0.84 的情况下快速生长，并能产生肠毒素 A[60]。个别肠毒素的产生更依赖于毒素本身的特性，而与产生毒素的菌株关系不大[78]。在细胞成长的指数阶段所产生的是肠毒素 A，而不是肠毒素 B[22]。在猪肉中，肠毒素 A 可以在 A_w0.86 条件下产生，而在 A_w 0.83 条件下不能产生；在牛肉中，肠毒素 A 可以在 A_w 0.88 条件下产生，而在 A_w0.86 条件下不能产生。肠毒素 A 可以在 A_w 不利于肠毒素 B 生成的条件下产生[97]。在脑心浸出液中，于 A_w0.86、37℃下培养 6d，可以产生肠毒素 D[81]。一般情况下，肠毒素 B 的产生对水分活度较为敏感，而肠毒素 C 的产生对水分活度和温度均较为敏感。有关 NaCl 和 pH 的影响方面，据报道肠毒素可以在 pH4.0 和不存在 NaCl 的情况下产生（参阅表 20.2）。在 pH7.0、37℃条件下，NaCl 对于 S-6 菌株肠毒素 B 合成的影响情况可以参阅图 20.1。

在生长温度方面，据报道[35]在 10℃下火腿中产生了肠毒素 B，而在煮熟的牛肉糜、火腿和腊肠中于 10℃下产生了少量的肠毒素 A、B、C 和 D[93]。据观察，在 46℃下仍有肠毒素的产生，但在蛋白质水解液培养基中，肠毒素 B 和肠毒素 C 的最佳产生温度是 40℃[95]，对于肠毒素 E，在 pH6.0 时的最佳产生温度也是 40℃[95]。人们已经证实，金黄色葡萄球菌在煮熟的牛肉上于 45.5℃下生长了 24h，但温度升至 46.6℃时，在同样的培养时间内菌体细胞的数量减少了 2 个数量级[16]。在 pH7.0 的培养基中，肠毒素 B 最佳产生温度是 39.4℃[77]。因此肠毒素产生的最佳温度范围在 40～45℃。

据报道，葡萄球菌肠毒素早在开始培养后的 4～6h 就能产生（图 20.2），并在生长的平衡期[61]和衰退期一直成比例增加（图 20.3）。肠毒素的产生在整个生长阶段几乎都能发生[23]，但是早期的研究发现，对于 S-6 菌株 95%的肠毒素 B 是在指数生长阶段后期释放的，氯霉素能抑制肠毒素的产生，这表明毒素的存在依赖于新蛋白质的合成[68]。在冰淇淋饼中，在 25℃下 18h 后产生了 3.9ng/g 肠毒素 A，而在 30℃下 14h 后产生了 4.8ng/g 肠毒素 A[44]。在这同一项研究中，耐热核酸酶在肠毒素 A 出现之前就已经被检测出来，这种酶在 37℃下于 12h 后的生成量为 72ng/g。用 3%酪蛋白胰酶水解物作为培养基在 37℃下培养时，在指数生长期和生长平衡期的初期产生了肠毒素 C_1 和肠毒素 C_2[74]。培养 10h 后，当金黄色葡萄球菌细胞浓度为 8.3×10^7cfu/mL 时，肠毒素 C_1 的检出浓度为 2ng/mL，而培养 5h 后，菌体细胞浓度只有 1.3×10^4cfu/mL 时，就已经可以检出耐热核酸酶。肠毒素 C_2 和最早在 7h 后就已经出现，这时的细胞浓度为 10^7cfu/mL[74]。在肠毒素 C_1 和

肠毒素 C_2 开始出现之前，耐热核酸酶的合成就已经停止了。

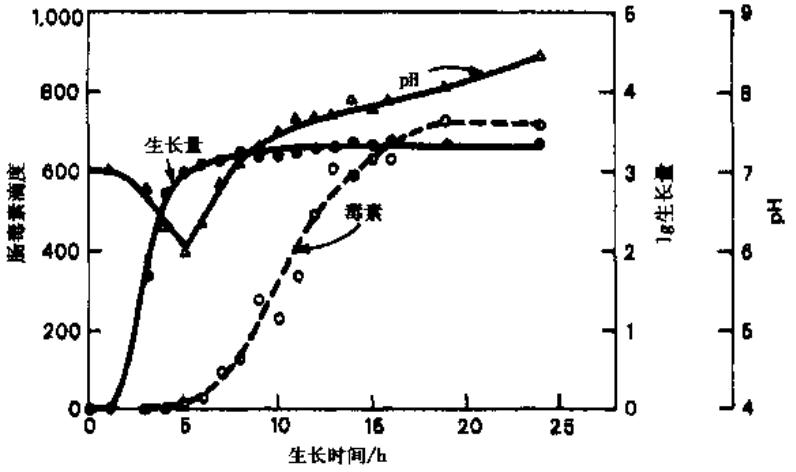


图 20.2　金黄色葡萄球菌在 37℃温度下的生长、肠毒素 B 产生和 pH 变化[64]

注：资料来源：McLean et al.[64]，copyright ©1968 by American Society for Microbiology。

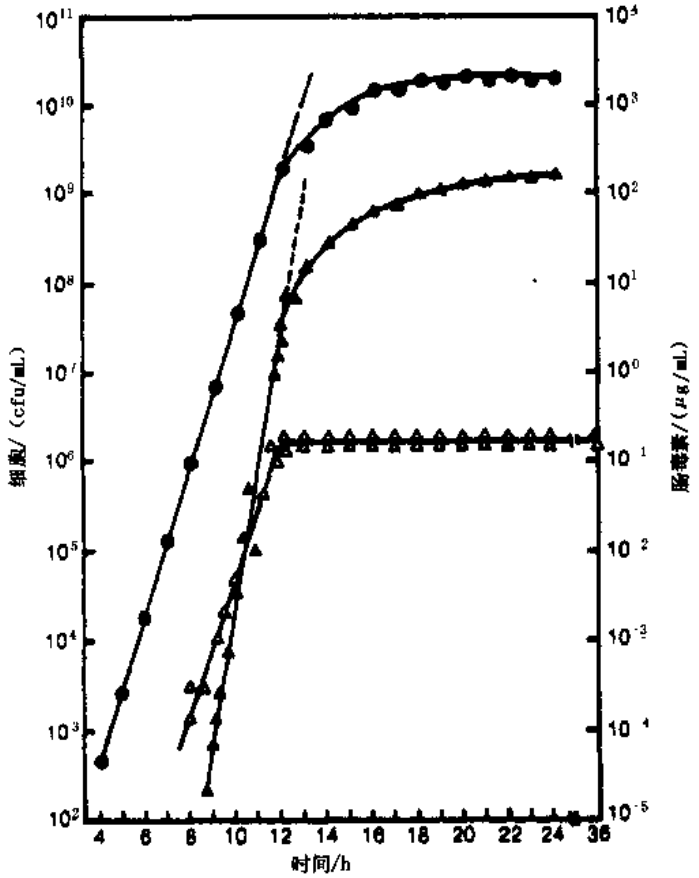


图 20.3　金黄色葡萄球菌 S-6 细胞生长速率与肠毒素 A 和 B 合成速率

●—细胞数　△　肠毒素 A　▲—肠毒素 B

注：资料来源 Czop and Bergdoll[23]，copyright ©1974 by American Society for Microbiology。

有一份报道提到，肠毒素 B 和肠毒素 C 的产生水平分别为 375 和 60μg/mL[82]。在一种蛋白质水解物培养基中，肠毒素 B 的产生量可达 500μg/mL[12]。采用 sac 培养方法，溶血葡萄球菌（*S. haemolyticus*）可以产生 289ng/mL 肠毒素 A，金黄色葡萄球菌可以产生 213ng/mL 肠毒素 C 或 779ng/mL 肠毒素 D[6]。

在无缓冲剂的培养基中，过量的葡萄糖可以抑制肠毒素 B 的产生[68]。链霉素、放线菌素 D，吖啶黄素、吐温 80 和其它化合物可以抑制肉汤中肠毒素 B 的合成[33]，肠毒素 B 的生成受 2 脱氧葡萄糖的抑制，这种抑制作用不能在加入葡萄糖之后得到解除，表明这种毒素的合成并不受代谢调节的控制[51]。虽然放线菌素 D 能呈现对 S-6 菌株肠毒素 B 合成的抑制作用，但这种抑制作用只出现在细胞停止合成的 1h 之后。放线菌素 D 能迅速和彻底抑制 S-6 菌株。对于这种现象的可能解释是，负责肠毒素合成的 mRNA 比负责细胞合成的 mRNA 更为稳定[57]。

能产生引起人体胃肠炎综合征的最低量（1ng/g）肠毒素所需金黄色葡萄球菌的最少细胞数似乎与菌体培养基和特定的肠毒素有关。据发现，在细胞浓度低达约 10^4cfu/mL 时，就已经可以检出肠毒素 A[44]。在牛乳中，当细胞数为 10^7，并不低于这一水平时，检出了肠毒素 A 和肠毒素 D[70]。在培养产生肠毒素 A、B 和 D 的金黄色葡萄球菌时，当细胞浓度达到 6×10^6cfu/mL 时，检出了肠毒素 B 和 D，它们的浓度为 1ng/mL，而细胞浓度达到 3×10^7cfu/mL 时，检出了浓度为 4ng/mL 的肠毒素 A[71]。在人造干酪中，当 pH 为 5.56～5.90 和 A_w 为 0.94～0.97 时，肠毒素在细胞浓度为下述值时就可以被开始检测出来：肠毒素 A 为 4×10^6/g，肠毒素 C 为 1×10^8/g，肠毒素 D 为 3×10^6/g，肠毒素 E 为 53×10^6/g、肠毒素 C 和肠毒素 E 为 3×10^6/g[10]。在预先蒸过的咸肉中，当 A100 菌株的细胞浓度＞10^4/g 时，可以产生肠毒素 A[86]。在肉制品和香子兰冻奶油中，当细胞浓度对数值≥lg7.2/g 时已产生了肠毒素 A，但在一些蔬菜产品中，肠毒素 A 的产生时间延迟，当细胞浓度对数值≥lg8.9/g 时才能检出这种毒素[73]。在后来的研究中，于 22℃培养 72h 后当细胞浓度对数值达到 lg6.7～8.7/g，在菠菜和法国青豆中未检出肠毒素。

20.8.3 毒素作用方式

葡萄球菌肠毒素与中毒性休克综合症毒素（TSST）和其它一些毒素一起被归类为鉴别体内抗原与普通抗原的细菌超级抗原。在普通抗原中，一种 CD4 T 细胞促进了 T-细胞抗原受体与主要组织相容复合体（MHC）第 11 类分子之间的接触。葡萄球菌超级抗原可以与 T-细胞受体的 6 条链直接结合而没有修饰过程。一旦肠毒素与 MHC 第 11 类分子结合之后，就会促进 T-细胞产生细胞素，如白细胞介素、γ-干扰素和肿瘤坏死因子等。超级抗原是能够激活许多不同 T-细胞克隆的蛋白质。在细胞素中，白细胞介素 2 生成量最多[56]，它似乎是导致许多或多数葡萄球菌胃肠炎综合征的诱因（见下述）。

葡萄球菌肠毒素分子的 C-端对于某些功能是关键的。在对于肠毒素 B 的一份研究中，仅从截下 9 个氨基酸残基就导致了对 T-细胞刺激能力的丧失[66]。据认为，C-端对于肠毒素 B 分子的三维构型是关键的[66]。在对肠毒素 C 的研究中可以得出结论，肠毒素 C 与主要组织相容复合体第 11 类分子的 α 螺旋结合，这样使得显示抗体性能的细胞与 T-细胞相互结合较为稳定，从而导致细胞素产生，并在后来导致淋巴细胞的增

殖[47]。

催吐作用与促进T-细胞增殖作用的关联关系可以被解除。当从C-端切下3个氨基酸残基而改变肠毒素A的结构以后，T-细胞增殖活性仍然被保留，但催吐作用消失[48]。采用突变后的肠毒素A和肠毒素B，与主要组织相容复合体第11类分子结合这一项特性还不足以使猴催吐[41]。

20.9 胃肠炎综合征

葡萄球菌食物中毒综合征一般在摄入污染食物之后4h发作，但也有在1～6h范围内发作的报道。这些中毒综合征有：恶心、呕吐、腹痛（一般相当剧烈）、腹泻、出汗、头痛、乏力，有时伴随体温下降，这些症状一般要延续24～48h，但它不会导致死亡或死亡率很低。对于健康人的治疗方法一般是卧床休息和维持体液平衡。当症状平息后，患者对重复感染不具有可证实的免疫性，但动物在反复口服之后对肠毒素会产生抗性[12]。因为这些综合征是摄入粗肠毒素的症状，可以认为粪便培养物对于这些微生物可能是阴性的。如果能从残剩的食物和患者的粪便中培养出产毒的葡萄球菌，则可以证实是葡萄球菌食物中毒。另外还应该尽力从可疑的食品中提取肠毒素，尤其是当分离的活细胞数量很少的时候。

能导致人体患病的肠毒素最低剂量约为20ng。这一数据来源于葡萄球菌胃肠炎发生时对2%巧克力乳进行分析得出的。从12盒乳中所分析的肠毒素A水平为94～184ng/盒，平均水平为144ng/盒[29]。肠毒素的感染速率与所摄入乳的质量有关，并且与人的年龄原有一定的关系，5～9岁的儿童要比10～19岁的少年更为敏感。早期的发现表明，使成人患病的纯肠毒素B剂量为20～35ng[79]。在16次葡萄球菌胃肠炎病例中，食品中所发现的肠毒素水平不足0.01～0.25μg/g[39]。

在许多或多数情况下，导致人体中毒的肠毒素是白细胞介素-2[56]，其症状包括呕吐和腹泻，这些症状可以由静脉注射诱发。

20.10 发生率与含毒食品

葡萄球菌在各种食品中的发生率可以参阅第三部分4～9。可以推测这些细菌会出现在很多未经过加热杀菌的食品中。

在胃肠炎爆发时，被报道的含有葡萄球菌肠毒素的食品的种类很多，一般手工制作和制作后不进行适当冷藏的食品可能含毒素。在1973—1987年间，报至美国疾病控制中心的发病次数和食品引发胃肠炎的患病人数概括在表20.7中。这种病1983年在胃肠炎中占了高达近16%的比例，而在1987年只占了1.0%的比例。然而，被报道的患病人数只是实际患病人数的很小一部分，据估计，美国每年患食物中毒葡萄球菌胃肠炎的人数在100万至200万之间。1973—1987年间发现的6种主要载毒食品列在表20.8中，其中猪肉和猪肉制品导致的中毒事件比其它5种食品加在一起还多。

表 20.7 1973～1987 年间美国食物引发的葡萄球菌胃肠炎的发病次数和患病人数[8]

年 份	发病次数	患病人数	占胃肠炎总数的比例/%
1973－1987	367	17248	14.0
1983	14	1257	15.9
1984	11	1153	14.1
1985	14	421	1.8
1986	7	250	4.3
1987	1	100	1.0

注：数据来自 Bean 和 Griffin[7]，Bean 等[8]。

表 20.8 1973～1987 年间美国引发葡萄球菌胃肠炎的食物源[7]

食 物 源	发病次数
猪肉	96
焙烤食品	26
牛肉	22
火鸡	20
鸡肉	11
鸡蛋	9

注：资料来源 Bean 和 Griffin[7]。

上述统计的问题之一是，所有很频繁地发生在家庭中的病例并没有报至公众健康管理部门。在所报的所有类型病例中，有很大一部分是来源于各种宴会，一般涉及的人数较多。

一次很特殊的发病是由于肠毒素 A 和肠毒素 D 引起的，最后发现它们来源于食醋中的野生蘑菇，其污染的食品中含有肠毒素 A 10ng/g 和肠毒素 D 1ng/g。

20.11 金黄色葡萄球菌的生长与生态

一般来说，葡萄球菌并不能与多数食品中的正常微生物群落进行有效地竞争，特别是在环境条件有利于乳酸菌生长而有大量乳酸菌存在时更是如此（见第二部分 3）。很多研究者都证明，金黄色葡萄球菌无能力在新鲜食品和冷冻食品中进行竞争。在有利于葡萄球菌生长的温度下，一般食品中的腐生菌群通过拮抗作用、营养竞争作用和改变环境条件使之对金黄色葡萄球菌不利于抑制葡萄球菌的生长。已知对金黄色葡萄球菌生长有拮抗作用的细菌包括：不动杆菌（*Acinetobacter*）、气单孢菌（*Aeromonas*）、芽孢杆菌（*Bacillus*）、假单胞菌（*Pseudomonas*）、表皮葡萄球菌、肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*）、乳杆菌科（*Lactobacillaceae*），肠球菌（*Enterococci*）和其它科属的细菌[69]。肠毒素 A 对很多不利的环境因素有抵抗力，但是有几种乳酸菌能导致这种毒素的减少，因此有人认

为肠毒素的减少是由于乳酸菌产生的酶或其它代谢物所致[20]。

20.12 葡萄球菌中毒和其它食物中毒综合征的预防

当生产的食品可能带有少量葡萄球菌时，如果在食用前能保存在4.4℃以下或60℃以上，它们将仍然不含肠毒素或其它能导致食物中毒的毒素。在1961—1972年间，Bryan[17]调查了700多起食物中毒的发生情况，以寻找致病因素与发病率之间的关系。在所鉴定出的16种因素中，与发病关系最密切的5种因素如下：

① 冷藏温度不够低；

②制成的食品存放时间过长；

③被感染者的个人卫生习惯不良；

④烹调或加热不充分；

⑤食物存放在有利于细菌繁殖的温度下。

冷藏温度不够低这一因素对发病的诱发率占25.5%。上述5种因素对发病的总诱发率为68%。这5种因素在1973—1987年间对发病的诱发率列在表20.9中。从表中可以注意到1961—1972年间的主要诱因仍然是这后续几年的主要诱因。可能会被污染的食品不能存放在适宜葡萄球菌生长的环境下3～4h以上。

表20.9 美国1973—1987年间导致葡萄球菌食物中毒型胃肠炎的诱因[3]

发病诱因	发病次数
存放温度不当	98
个人卫生习惯不良	71
设备污染	43
烹调或加热不充分	22
食品来源于不安全的原料	12
其它	24

注：资料来源Bean和Griffin[7]。

参考文献

[1] Adesiyun, A. A., L. Webb, and S. Rahaman. 1995. Microbiological quality of raw cow's milk at collection centers in Trinidad. *J. Food Protect.* 58: 139～146.

[2] Adesiyun, A. A. 1984. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated fron Nigerian ready-to-eat foods. *J. Food Protect.* 47: 438～440.

[3] Adesiyun, A. A., S. R. Tatini, and D. G. Hoover. 1984. Production of enterotoxin(s) by *Staphylococcus hyicus*. *Vet. Microbiol.* 9: 487～495.

[4] Angelotti, R., M. J. Foter, and K. H. Lewis. 1961. Time-temperature effects on salmonellae and staphylococci in foods. *Amer. J. Pub. Hlth.* 51: 76～88.

[5] Angelotti, R., M. J. Foter, and K. H. Lewis. 1960. Time-temperature effects on salmonellae and staphylococci in foods. Ⅱ. Behavior at warm holding temperatures. Thermal-Death-Time Studies. Cincinnati, OH: Public Health Service, U. S. Department of Health, Education and Welfare.

[6] Bautista, L., P. Gaya, M. Medina, and M. Nunez. 1988. A quantitative study of enterotoxin production by sheep milk staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 566～569.

[7] Bean, N. H., and P. M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States. 1973～1987: Pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Protect.* 53: 804～817.

[8] Bean, N. H., P. M. Griffin, J. S. Goulding, and C. B. Ivey. 1990. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983-1987. *J. Food Protect.* 53: 711～728.

[9] Bennett, R. W., and M. R. Berry, Jr. 1987. Serological reactivity and in vivo toxicity of *Staphylococcus aureus* enterotoxins A and D in selected canned foods. *J. Food Sci.* 52: 416～418.

[10] Bennett, R. W., and W. T. Amos. 1983. *Staphylococcus aureus* growth and toxin production in imitation cheeses. *J. Food Sci.* 48: 1670～1673.

[11] Bergdoll, M. S. 1967. The staphylococcal enterotoxins. In *Biochemistry of Some Foodborne Microbial Toxins*, ed. R. I. Mateles and G. N. Wogan. 1～25. Cambridge, MA: MIT Press.

[12] Bergdoll, M. S. 1972. The enterotoxins. In *The Staphylococci*, ed. J. O. Cohen, 301～331. New York: Wiley-Interscience.

[13] Bergdoll, M. S. 1990. Staphylococcal food poisoning. In *Foodborne Diseases*, ed. D. O. Cliver. 85～106. New York: Academic Prees.

[14] Betley, M. J., D. W. Borst, and L. B. Regassa. 1992. Staphylococcal enterotoxins, toxic shock syndrome toxin and streptococcal pyrogenic exotoxins: A comparative study of their molecular biology. *Chem. Immunol.* 55: 1～35.

[15] Borja, C. R., and M. S. Bergdoll. 1967. Purification and partial characterization of enterotoxin C produced by *Staphylococcus aureus* strain 137. *J. Biochem.* 6: 1457～1473.

[16] Brown, D. F., and R. M. Twedt. 1972. Assessment of the sanitary effectiveness of holding temperatures on beef cooked at low temperature. *Appl. Microbiol.* 24: 599～603.

[17] Bryan, F. L. 1974. Microbiological food hazards today—based on epidemiological information. *Food Technol.* 28 (9): 52～59.

[18] Casman, E. P. 1965. Staphylococcal enterotoxin. In *The Staphylococci: Ecologic Perspectives*, Annals of the New York Academy of Science, vol. 28, 128: 124～133.

[19] Casman, E. P., R. W. Bennett, A. E. Dorsey, and J. A. Issa. 1967. Identification of a fourth staphylococcal enterotoxin, enterotoxin D. *J. Bacteriol.* 94: 1875～1882.

[20] Chordash, R. A., and N. N Potter. 1976. Stability of staphylococcal enterotoxin A to selected conditions encountered in foods. *J. Food Sci.* 41: 906～909.

[21] Couch, J. L., and M. J. Betley. 1989. Nucleotide sequence of the type C_3 staphylococcal enterotoxin gene suggests that intergenic recombination causes antigenic variation. *J. Bacteriol.* 171: 4507～4510.

[22] Czop, J. K., and M. S. Bergdoll. 1970. Synthesis of enterotoxins by L-forms of *Staphylococcus aureus*. *Infect. Immun.* 1: 169～173.

[23] Czop, J. K., and M. S. Bergdoll. 1974. Staphylococcal enterotoxin synthesis during the exponential, transitional, and stationary growth phases. *Infect. Immun.* 9: 229～235.

[24] Dack, G. M., W. E. Cary, O. Woolpert, and H. Wiggers. 1930. An outbreak of food poisoning

proved to be due to a yellow hemolytic staphylococcus. *J. Prev. Med.* 4: 167～175.

[25] Denny, C. B., J. Y. Humber, and C. W. Bohrer. 1971. Effect of toxin concentration on the heat inactivation of staphylococcal enterotoxin A in beef bouillon and in phosphate buffer. *Appl. Microbiol.* 21: 1064～1066.

[26] Denny, C. B., P. L. Tan, and C. W. Bohrer. 1966. Heat inactivation of staphylococcal enterotoxin. *J. Food Sci.* 31: 762～767.

[27] Ellender, R. D., L. Huang, S. L. Sharp, and R. P. Tettleton. 1995. Isolation, enumeration, and identification of Gram-positive cocci from frozen crabmeat. *J. Food Protect.* 58: 853～857.

[28] Evans, J. B., G. A. Ananaba, C. A. Pate, and M. S. Bergdoll. 1983. Enter otoxin production by atypical *Staphylococcus aureus* from poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 54: 257～261.

[29] Evenson, M. L., M. W. Hinds, R. S. Bernstein, and M. S. Bergdoll. 1988. Estimation of human dose of staphylococcal enterotoxin A from a large outbreak of staphylococcal food poisoning involving chocolate milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7: 311～316.

[30] Ewald, S. 1987. Enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* strains isolated from Danish foods. *Int. J. Food Microbiol.* 4: 207～214.

[31] Ewald, S., and S. Notermans. 1988. Effect of water activity on growth and enterotoxin D production of *Staphylococcus aureus*. *Int. J. Food Microbiol.* 6: 25～30.

[32] Freney, J., Y. Brun, M. Bes, H. Meugnier, F. Grimont, P. A. D. Grimont, C. Nervi, and J. Fleurette. 1988. *Staphylococcus lugdunensis* sp. nov. and *Staphylococcus schleiferi* sp. nov., two species from human clinical specimens. *Int. J. System. Bacteriol.* 38: 168～172.

[33] Friedman, M. E. 1966. Inhibition of staphylococcal enterotoxin B formation in broth cultures. *J. Bacteriol.* 92: 277～278.

[34] Genigeorgis, C., M. S. Foda, A. Mantis, and W. W. Sadler. 1971. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin C production. *Appl. Microbiol.* 21: 862～866.

[35] Genigeorgis, C., H. Riemann, and W. W. Sadler. 1969. Production of enterotoxin B in cured meats. *J. Food Sci.* 34: 62～68.

[36] Genigeorgis, C., and W. W. Sadler. 1966. Effect of sodium chloride and pH on enterotoxin B production. *J. Bacteriol.* 92: 1383～1387.

[37] Genigeorgis, C., and W. W. Sadler. 1966. Characterization of strains of *Staphylococcus aureus* isolated from livers of commercially slaughtered poultry. *Poultry Sci.* 45: 973～980.

[38] Gibbs, P. A., J. T. Patterson, and J. Harvey. 1978. Biochemical characteristics and enterotoxigenicity of *Staphylococcus aureus* strains isolated from poultry. *J. Appl. Bacteriol.* 44: 57～74.

[39] Gilbert, R. J., and A. A. Wieneke. 1973. Staphylococcal food poisoning with special reference to the detection of enterotoxin in food. In *The Microbiological Safety of Food*, ed. B. C. Hobbs and J. H. B. Christian, 273～285. New York: Academic Press.

[40] Gomez-Lucia, E., J. Goyache, J. L. Blanco, J. F. F. Garayzabal, J. A. Orden, and G. Suarez. 1987. Growth of *Staphylococcus aureus* and enterotoxin production in homemade mayon naise prepared with different pH values. *J. Food Protect.* 50: 872～875.

[41] Harris, T. O., D. Grossman, J. W. Kappler, P. Marrack, R. R. Rich, and M. J. Betley. 1993. Lack of complete correlation between emetic and T-cell stimulatory activities of staphylococcal enterotoxins. *Infect. Immun.* 61: 3175～3183.

[42] Harvey, J., J. T. Patterson, and P. A. Gibbs. 1982. Enterotoxigenicity of *Staphylococcusaureus*

strains isolated from poultry: Raw poultry carcasses as a potential food-poisoni hazard. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 251～258.

[43] Hirooka, E. Y., E. E. Muller, J. C. Freitas, E. Vicente. Y. Yashimoto, and M. S. Bergde 1988. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus intermedius* of canine origin. *Int. J. Food Microbiol.* 7: 185～191.

[44] Hirooka, E. Y., S. P. C. DeSalzberg, and M. S. Bergdoll. 1987. Production of staphylococcal enterotoxin A and thermonuclease in cream pies. *J. Food Protect.* 50: 952～955.

[45] Hoover, D. G., S. R. Tatini. and J. B. Maltais. 1983. Characterization of staphylococci. *Apl Environ. Microbiol.* 46: 649～660.

[46] Huang, I. -Y., and M. S. Bergdoll. 1970. The primary structure of staphylococcal enterotox B. Ⅱ. The cyanogen bromide peptides of reduced and aminoethylated enterotoxin B and the complete amino acid sequence. *J. Biol. Chem.* 245: 3518～3525.

[47] Hoffmann, M. L., L. M. Jablonski, K. K. Crum, S. P. Hackett, Y. J. Chi, C. V. Stauffache D. L. Stevens and G. A. Bohach. 1994. Predictions of T-cell receptor-and maj histocompatibility complex-binding sites on staphylococcal enterotoxin C1. *Infect. Immum.* 62: 3396～3407.

[48] Hufnagle, W. O., M. T. Tremaine, and M. J. Betley. 1991. The carboxyl-terminal region staphylococcal enterotoxin type A is required for a fully active molect le. *Infect. Immum* 59: 2126～2134.

[49] Hurst, A., and A. Hughes. 1983. The protective effect of some food ingredients on *Staphylococcus aureus* MF 31. *J. Appl. Bacteriol.* 55: 81～88.

[50] Iandolo, J. J 1989. Genetic analysis of extracellular toxins of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Rev. Microbiol.* 43: 375～402.

[51] Iandolo, J. J., and W. M. Shafer. 1977. Regulation of staphylococcal enterotoxin B. *Infec Immun.* 16: 610～616.

[52] Isigidi, B. K., A. M. Mathieu, L. A. Devriese, C. Godard, and J. van Hoof. 1992. Enterotox production in different *Staphylococcus aureus* biotypes isolated from food and meat plant *J. Appl. Bacteriol.* 72: 16～20.

[53] Isigidi, B. K., L. A. Devriese. C. Godard, and J. van Hoof. 1990. Characteristics of *Staphylococcus aureus* associated with meat products and meat workers. *Lett. Appl. Microt* 11: 145～147.

[54] Jarvis, A. W., R. C. Lawrence, and G. G. Pritchard. 1973. Production of staphylococcal enterotoxins A. B, and C under conditions of controlled pH and aeration. *Infect. Immun.* 7: 847～854.

[55] Jay, J. M. 1970. Effect of borate on the growth of coagulase-positive and coagulase-negati staphylococci. *Infect. Immun.* 1: 78～79.

[56] Johnson, H. W., J. K. Russell, and C. H. Pontzer. 1992. Super-antigens in human diseas *Sci. Amer.* 266 (4): 92～101.

[57] Kadan, R. S., W. H. Martin. and R. Mickelsen. 1963. Effects of ingredients used in condensed and frozen dairy products on thermal resistance of potentially pathogenic staphylococci *Appl. Microbiol.* 11: 45～49.

[58] Katsuno, S., and M. Kondo. 1973. Regulation of staphylococcal enterotoxin B synthesis atits relation to other extracellular proteins *Jap J. Med. Sci. Biol.* 26: 26～29.

[59] Kloos. W. E. and T. L. Bannerman. 1994. Update on clinical significance of coagulas negative staphylococci. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 117～140.

[60] Lee, R. Y., G. J. Silverman. and D. T. Munsey. 1981. Growth and enterotoxin A production

by *Staphylococcus aureus* in precooked bacon in the intermediate moisture range. *J. Food Sci.* 46: 1687～1692.

[61] L illy, H. D., R. A. McLean, and J. A. Alford. 1967. Effects of curing salts and temperature on production of staphylococcal enterotoxin. *Bacteriol. Proc.*, 12.

[62] Lindroth, S., E. Strandberg, A. Pessa, and M. J. Pellinen. 1983. A study of the growth potential of *Staphylococcus aureus* in *Boletus edulis*, a wild edible mushroom, prompted by a food poisoning outbreak. *J. Food Sci.* 48: 282～283.

[63] Marin, M. E., M. C. de la Rosa, and I. Cornejo. 1992. Enterotoxigenicity of *Staphylococcus* strains isolated from Spanish dry-cured hams. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 1067～1069.

[64] McLean, R. A., H. D. Lilly, and J. A. Alford. 1968. Effects of meat- curing salts and temperature on production of staphyoccoccal enterotoxin B. *J. Bacteriol.* 95: 1207～1211.

[65] Metzger, J. F., A. D. Johnson, W. S. Collins, I, and V. McGann. 1973. *Staphylococcus aureus* enterotoxin B release (excretion) under controlled conditions of fermentation. *Appl. Microbiol.* 25: 770～773.

[66] Metzroth, B., T. Marx. M. Linnig, and B. Fleischer. 1993. Concomitant loss of conformation and superantigenic activity of staphylococcal enterotoxin B deletion mutant proteins. *Infect. Immun.* 61: 2445～2452.

[67] Miller, R. D., and D. Y. C. Fung. 1973. Amino acid requirements for the production of enterotoxin B by *Staphylococcus aureus* S-6 in a chemically defined medium. *Appl. Microbiol.* 25: 800～806.

[68] Morse, S. A., R. A. Mah, and W. J. Dobrogosz. 1969. Regulation of staphylococcal enterotoxin B. *J. Bacteriol.* 98: 4～9.

[69] Mossel, D. A. A. 1975. Occurrence, prevention, and monitoring of microbial quality loss of foods and dairy products. *CRC Crit. Rev. Environ. Control* 5: 1～140.

[70] Noleto, A. L., and M. S. Bergdoll. 1980. Staphylococcal enterotoxin production in the presence of nonenterotoxigenic staphylococci. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 1167～1171.

[71] Noleto, A. L., and M. S. Bergdoll. 1982. Production of enterotoxin by a *Staphylococcus aureus* strain that produces three identifiable enterotoxins. *J. Food Protect.* 45: 1096～1097.

[72] Notermans, S., and C. J. Heuvelman. 1983. Combined effect of water activity, pH and suboptimal temperature on growth and enterotoxin production of *Staphylococcus aureus*. *J. Food Sci.* 48: 1832～1835, 1840.

[73] Notermans, S., and R. L. M. van Otterdijk. 1985. Production of enterotoxin A by *Staphylococcus aureus* in food. *Int. J. Food Microbiol.* 2: 145～149.

[74] Otero, A., M. L. Garcia, M. C. Garcia, B. Moreno, and M. S. Bergdoll. 1990. Production of staphylococcal enterotoxins C_1 and C_2 and thermonuclease throughout the growth cycle. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 555～559.

[75] Palasuntheram, C., and M. S. Beauchamp. 1982. Enterotoxigenic staphylococci in Sri Lanka. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 39～41.

[76] Palumbo, S. A., J. L. Smith, and J. C. Kissinger. 1977. Destruction of *Staphylococcus aureus* during frankfurther processing. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 740～744.

[77] Payne, D. N., and J. M. Wood. 1974. The incidence of enterotoxin production in strains of *Staphylococcus aureus* isolated from foods. *J. Appl. Bacteriol.* 37: 319～325.

[78] Pereira, J. L., S. P. Salzberg, and M. S. Bergdoll. 1982. Effect of temperature, pH and sodium

chloride concentrations on production of staphylococcal enterotoxins A and B. *J. Food Protect.* 45: 1306～1309.

[79] Raj, H. D., and M. S. Bergdoll. 1969. Effect of enterotoxin B on human volunteers. *J. Bacteriol.* 98: 833～834.

[80] Read, R. B., and J. G. Bradshaw. 1966. Thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B in veronal buffer. *Appl. Microbiol.* 14: 130～132.

[81] Reiser, R. F., R. N. Robbins, A. L. Noleto, G. P. Khoe, and M. S. Bergdoll. 1984. Identification, purification, and some physiochemical properties of staphylococcal enterotoxin C_3. *Infect. Immun.* 45: 625～630.

[82] Reiser, R. F., and K. F. Weiss. 1969. Production of staphylococcal enterotoxins A, B, and C in various media. *Appl. Microbiol.* 18: 1041～1043.

[83] Satterlee, L. D., and A. A. Kraft. 1969. Effect of meat and isolated meat proteins on the thermal inactivation of staphylococcal enterotoxin B. *Appl. Microbiol.* 17: 906～909.

[84] Schantz, E. J., W. G. Roessler, J. Wagman, L. Spero, D. A. Dunnery, and M. S. Bergdoll. 1965. Purification of staphylococcal enterotoxin B. *J. Biochem.* 4: 1011～1016.

[85] Stems, H., D. Kusch, H. -J. Sinell, and F. Untermann. 1971. Vorkommen und Eigenschaften von Staphylokokken in verschiedenen Produktionsstufen bei der Fleischverarbeitung. *Fleischwirts.* 51: 1529～1533.

[86] Silverman, G. J., D. T. Munsey, C. Lee, and E. Ebert. 1983. Interrelationship between water activity, temperature and 5.5 percent oxygen on growth and enterotoxin A secretion by *Staphylococcus aureus* in precooked bacon. *J. Food Sci.* 48: 1783～1786, 1795.

[87] Simkovicová, M., and R. J. Gilbert. 1971. Serological detection of enterotoxin from food poisoning strains of *Staphylococcus aureus*. *J. Med. Microbiol.* 4: 19～30.

[88] Smith, J. L., R. L. Buchanan, and S. A. Palumbo. 1983. Effect of food environment on staphylococcal enterotoxin synthesis: A review. *J. Food Protect.* 46: 545～555.

[89] Sokari, T. G., and S. O. Anozie. 1990. Occurrence of enterotoxin producing strains of *Staphylococcus aureus* in meat and related samples from traditional markets in Nigeria. *J. Food Protect.* 53: 106～1070.

90 Sperber, W. H. 1977. The identification of staphylococci in clinical and food microbiology laboratories. *CRC Crit. Rev. Clin. Lab. Sci.* 7: 121～184.

[91] Su, Y-C., and A. C. L. Wong. 1996. Detection of staphylococcal enterotoxin H by an enzymelinked immunosorbent assay. *J. Food Protect.* 59: 327～330.

[92] Su, Y-C., and A. C. L. Wong. 1995. Identification and purification of a new staphylococcal enterotoxin, H. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1438～1443.

[93] Tatini, S. R. 1973. Influence of food environments on growth of *Staphylococcus aureus* and production of various enterotoxins. *J. Milk Food Technol.* 36: 559～563.

[94] Thomas, C. T., J. C. White, and K. Longree. 1996. Thermal resistance of salmonellae and staphylococci in foods. *Appl. Microbiol.* 14: 815～820.

[95] Thota, F. H., S. R. Tatini, and R. W. Bennett. 1973. Effects of temperature, pH and NaCl on production of staphylococcal enterotoxins E and F. *Bacteriol. Proc.*, 1.

[96] Tibana, A., K. Rayman, M. Akhtar, and R. Szabo. 1987. Thermal stability of staphylococcal enterotoxins A, B and C in a buffered system. *J. Food Protect.* 50: 239～242.

[97] Troller, J. A. 1972. Effect of watet activity on enterotoxin A production and growth of *Staphylococcus aureus*. *Appl. Microbiol.* 24: 440～443.

[98] Valle, J., E. Gomez-Lucia, S. Piriz, J. Goyache, J. A. Orden, and S. Vadillo. 1990. Enterotoxin production by staphylococci isolated from healthy goats. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1323～1326.

[99] Vandenbosch, L. L., D. Y. C. Fung, and M. Widomski. 1973. Optimum temperature for enterotoxin production by *Staphylococcus aureus* S-6 and 137 in liquid medium. *Appl. Microbiol.* 25: 498～500.

[100] Veraldo, P. E. R. Kilpper-Balz, F. Biavasco, G. Satta, and K. H. Schleifer. 1988. *Staphylococcus delphini* sp. nov., a coagulase-positive species isolated from dolphins. *Int. J. System. Bacteriol.* 38: 436～439.

[101] Woodburn, M., M. Bennion, and G. E. Vail. 1962. Destruction of salmonellae and staphylococci in precooked poultry products by heat treatment before freezing. *Food Technol.* 16: 98～100.

[102] Wu, C. -H., and M. S. Bergdoll. 1971. Stimulation of enterotoxin B production. *Infect. Immun.* 3: 784～792.

21. 革兰氏阳性产孢子细菌食物中毒

已知能引起细菌性食物中毒的革兰氏产孢子杆菌至少有 3 种：产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）、（魏氏梭菌 *C. welchii*）、肉毒梭菌（*C. botulinum*）、蜡状芽孢杆菌（*Bacillus cereus*）。如同一般的食物中毒一样，这 3 种菌的食物中毒发生率与某些特定的食品有关。

21.1 产气荚膜梭菌食物中毒

这种病症的病原菌是革兰氏阳性、厌氧产生孢子的杆形菌，它们广泛分布于自然界中。根据它们产生特定外毒素的能力，可以将它们分成 A、B、C、D 和 E 五种类型。导致食物中毒的菌株属于类型 A，一些典型的腐生产气菌株也属于这一类，但导致食物中毒的 A 型菌株与后者不同的是，它们一般是耐热的，只能产生痕量的 α 毒素。许多 C 型菌株产生肠毒素，可以引发食物中毒综合征。典型食物中毒病原菌株与 C 型菌株的不同之处在于它们不产生 β-毒素。从肠炎坏死细胞中分离的 C 型菌株与热敏感 A 型和耐热 A 型菌株的比较可以参阅表 21.1。耐热 A 型菌株产生 θ-毒素，称为荚膜梭菌溶血素 O（PLO），是一种类似于李斯特菌溶血素 O（LLO）的硫醇激活溶血素。LLO 是由产单核细胞李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）产生的（将在第七部分 22 中讨论）。如同 LLO 一样，PLO 的分子质量为 6×10^4u。它已经被克隆和排序。

表 21.1　　A 型和 C 型魏氏梭菌毒素

魏氏梭菌	毒素										
	α	β	γ	δ	ε	θ	ζ	κ	λ	μ	ν
热敏感型 A	+++	−	−	−		++	--	+l		+或−	+
耐热型 A	±或痕量	−	−	−	−	−	--	+或−	-	++--或	-
耐热型 C	+	+	+	−	−	-	−	−	−	-	+

注：资料来源 B.C. Hobbs. 1962. 细菌食物中毒，London：Royal Society of Health。

虽然自 1895 年来人们就怀疑产气荚膜梭菌与胃肠炎有关，但第一次明确证实它是食物中毒的病因是由 McClung 完成的[69]。他调查了 4 起发病事件，证明鸡肉是病菌的载体。这种食物中毒综合征特性是最早详细报道是 Hobbs 等人在英国发表的[41]。虽然在 1940～1960 年间英国的研究者对于这种食物中毒病原菌较为了解，但在 1960 年之前美国很少有这种菌的报道。现在已经明确的是，产气荚膜梭菌食物中毒在美国和其它国家是普遍

存在的。

21.1.1 产气荚膜梭菌的分布

能导致食物中毒的产气荚膜梭菌菌株存在于土壤、水源、食物、灰尘、调味品和人及其它动物的肠道中。不同的研究者报道在普通人群中耐热型非溶血性菌株的发生率为2%～6%。据报道，医院中健康人群和他们的家人在他们的粪便中发现带菌比例为20%～30%，而患者在患病2周后的带菌比例可达50%，甚至高达88%[21]。热敏感型菌株在所有人的肠道中是普遍存在的。产气荚膜梭菌会直接进入屠宰后的动物肉中，或后来通过容器、工具或灰尘感染肉类。因为它们可以产生孢子，所以可以耐受干燥、加热和某些毒性化合物存在的不良环境。

21.1.2 产气荚膜梭菌的特性

产气荚膜梭菌中引起食物中毒的菌株和其它菌株可以在厌氧条件和具有充足还原能力的很多培养基中生长良好。从马肌肉中分离的产气荚膜梭菌菌株在氧化还原电位（Eh）为－45V或更低的条件下生长良好而无迟滞期。而较高的Eh值能延长它的迟滞期[7]。虽然在各种培养基中培养这些菌株并不困难，但要这些菌群占优势是困难的，它需要采用特殊的培养基，例如采用Duncan和Strong培养基[22]。或采用特定的培养技术（如透析袋培养技术）。

产气荚膜梭菌是嗜温细菌。最适生长温度为37℃～45℃。它的最低生长温度约为20℃。最高生长温度约为50℃。在巯基乙酸盐培养基中，6株菌的最适生长温度为30～40℃，在Ellner培养基中的最佳产孢子温度为37～40℃[89]。在其它培养条件都是最佳状态下，生长在45℃下的代时只有7min。许多菌株的生长pH范围为5.5～8.0，一般在5.0以下或8.5以上不能生长。据报道在用蔗糖或NaCl调节水分活度时，生长和产生孢子的最低A_w值为0.97和0.95，而在有巯基乙酸盐存在的液体基础培养基中用甘油调节水分活度时的A_w值为0.93[49]。产生孢子时需要的A_w值似乎要高于允许生长的最低A_w值。虽然Labbe和Duncan[54]证明在pH5.5下A型菌株可以生长，但不能产生孢子或毒素。pH8.5似乎是适宜生长的最高pH。产气荚膜梭菌并不像某些其它梭状菌那样严格厌氧。人们已经观察到它可以在Eh＝＋320mV的条件下生长[84]。这种菌生长时至少需要13种氨基酸，并且需要生物素、泛酸、吡哆醛、腺嘌呤和其它有关化合物。它是异型发酵菌，可以利用很多种碳水化合物。在约5% NaCl存在的情况下，其生长受到抑制。引发食物中毒菌株的内生孢子的耐热性有所不同，有些是典型嗜温类型，而另外一些是高度耐热的类型。据报道，产气荚膜梭菌ATCC 3624在100℃下的D值为0.31，而NCTC 8238菌株在100℃下的D值为17.6[116]。在8株能导致兔中毒反应的菌株中，100℃以下的D值范围为0.70～38.37。

有几组研究者考察了在水浴中低温长时间（LTLT）加热时营养细胞的致死情况。在已灭菌的牛肉泥中培养ATCC 13124菌株时，56.8℃下的D值为48.3min，这与磷脂酶C在56.8℃或47.9℃下的D值基本是一致的[27]。采用已灭菌的牛肉泥培养NCTC 8798菌株时，发现细胞的D值随着培养温度的增加而增加。对于培养在37℃下的菌株，$D_{59℃}$

为 3.1min，生长在 45℃下的菌株 $D_{59℃}$ 为 7.2min，而生长在 49℃下的菌株 $D_{59℃}$ 为 10.6min[90]。虽然上述两株菌其耐热性的巨大差别可能部分是由于菌株本身的差别，但是加热介质中的脂肪也可能起重要的作用，据报道，将袋装熟牛肉在 60～61℃的水浴中加热，并维持产品内部的温度在 60℃至少 12min 后，完全杀死了沙门氏菌，并使产气荚膜梭菌菌群的数量减少了约 3 个对数值，要使 1.5kg 牛肉中细菌细胞数减少 12 个对数值。至少需要在 60℃维持 2.3h 以上[76]。要使缓冲液和肉汤中的产气荚膜梭菌肠毒素完全失活，需要在 61℃分别维持 25.4min 和 23.8min[10]。

虽然有记载报道产气荚膜梭菌的耐热性的巨大差别可能与多种因素有关，但对于肉毒梭菌（尤其是 A 型菌和 B 型菌）还没有类似的报道。肉毒梭菌不像产气荚膜梭菌那样在人体肠道内普遍存在。一种微生物生态环境如此巨大的变化可以意味着它们菌株之间的差别也很大。对于细菌孢子耐热性有重要影响的另一个因素是化学环境。Alderton 和 Snell[2]指出孢子的耐热性在很大程序上是一种诱导特性，从化学性质上分析孢子的敏感性和耐热性状态之间是可逆的。在这一设想下，他们证明用醋酸钙溶液处理（例如在醋酸钙浓度为 0.1 或 0.5mol/L、pH8.5、50℃条件下处理 140h）后可以使孢子更为耐热。用这种方法可以使内生孢子的耐热性增加 5～10 倍[1]。另一方面，将孢子在 0.1mol/L HCl 中于 25℃下（这种环境类似于某些食品的自然酸性条件）处理 16h 可以使孢子的耐热性下降。可以想象产气荚膜梭菌孢子耐热性的高度可变性或多或少是由于直接环境作用的结果。

Strong 和 Canada[105]研究了产气荚膜梭菌在鸡汤中经过冷冻之后的存活情况，他们发现当冷冻至－17.7℃维持 180d 后，这种菌的存活率只有 4%。另一方面，干燥的孢子在 90d 之后的存活率可高达 40%，但 180d 之后只有 11%。

在一般流行病学研究中常采用血清型分析方法，但是因为产气荚膜梭菌的血清型太多，因此在特定的血清型与发病病因之间还未找出对应的关系。人们已经对 A 型菌株的细菌素进行了分类，在涉及食物中毒的 90 株菌中，所有的菌株都可以根据 8 种细菌毒素进行归类，其中属于 1～6 型细菌素的占 85.6%。

21.1.3 肠毒素

产气荚膜梭菌食物中毒的致病因子是肠毒素。与众不同的是它是一种孢子特异性蛋白质，它的生成是与孢子的产生相关联的。所有已知的能导致食物中毒的这种菌都属于 A 型菌株。另外一种无关的疾病——坏死性肠炎是由 C 型菌株产生的 β-毒素引起的，它仅在新几内亚偶见报道。C 型菌株引发的坏死性肠炎所导致的死亡率可高达 35%～40%，但 A 型菌株食物中毒只能导致老人或其它抵抗力很弱的人死亡。某些 C 型菌株能产生肠毒素，但它们在致病方面的作用还不清楚。

Duncan 和 Strong[23]证实了 A 型菌株可以产生肠毒素。纯化后的肠毒素分子质量为 35000u，等电点为 4.3[10]。它对热和链霉蛋白酶敏感（在 60℃，10min 后生物活性丧失），但是对胰蛋白酶、胰凝乳蛋白酶和木瓜蛋白酶有抗性[104]。L-型产气荚膜梭菌可以产生毒素，在一份研究中它们被证明能与经典型一样产生肠毒素。

产气荚膜梭菌肠毒素是在产生孢子阶段后期由产孢子细胞合成的。毒素生成的峰值

正好是在细胞的孢子囊自溶时出现的，从而使肠毒素与孢子一起释放出来。有利于产孢子的条件也有利于产生肠毒素，这种情况在采用棉子糖[57]、咖啡因和咖啡碱[56]的场合下都得到了证实。这后两种化合物使肠毒素的水平从检测不出增加到每毫升细胞浸出蛋白含 450μg。现在已经证明，这种肠毒素类似于孢子结构蛋白，它能与孢子壁以共价键结合。细菌细胞可以在肠道和很多种食品中自由地产生孢子。在培养基中，肠毒素通常只能在允许内生孢子形成的条件下产生（图 21.1），但营养细胞也可以产生少量的肠毒素[35,36]。有一段单独的基因显示它负责肠毒素的编码[21,22]，肠毒素和一种孢子壁蛋白质的合成似乎是由一段稳定的 mRNA 控制的[55]。

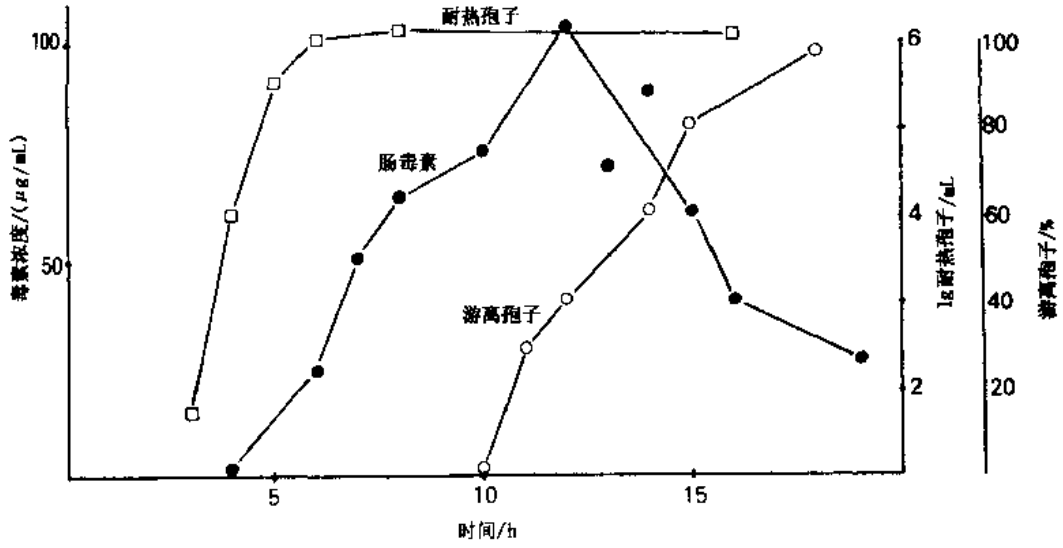


图 21.1　A 型产气荚膜梭菌产生孢子和肠毒素动力学[53]

注：根据资料（Labbe[53]；copyright ©1980 by institute of Food Technologists）。

肠毒素可以出现在生长培养基和产孢子培养基中，它约在接种营养细胞后 3h 内出现[20]，有 3 株产气荚膜梭菌在 Duncan-Strong 培养基（DS 培养基）中于 24～36h 后产生肠毒素的水平为 1～100μg/mL[28]。有文献报道，某些食物中可能存在预先产生的肠毒素，在少数情况下它们会引起发病的早期症状。纯化的肠毒素含有的毒素剂量可达每毫克氮致死 3500 只老鼠。

产气荚膜梭菌肠毒素可以在患者粪便中检测出来。在一起病例中，患者粪便中的肠毒素含量为 13～16μg/g，而在另一起患者症状较轻的病例中，从粪便中检出的肠毒素含量为 3～4μg/g[93]。

毒素作用模式

产气荚膜梭菌肠毒素与葡萄球菌肠毒素一样是一种超级抗原（参阅第七部分 20 毒素作用模式一段）。这种毒素具有改变细胞通透性，并使细胞具有最终自溶的能力。它还能抑制大分子的合成。

这种肠毒素可以与肠膜细胞的绒毛边缘结合。这种结合是专一性的，与时间和温度有关，而且是不可逆的（图 21.2）。有迹象表明，分子质量为 3.5×10^4u 的毒素分子与

5×10^4u的寄主细胞膜受体结合后产生一种 9×10^4u 的复合物。这种复合物与一种 7×10^4u 的膜蛋白反应形成一种 1.6×10^5u 的复合物。生成这些复合物的结果之一是损伤了寄主细胞膜，导致膜通透性的改变。现在已经证实。在这种肠毒素的影响下，回肠中 H_2O、Na^+和 Cl^-的净迁移是相反的。而 K^+和 HCO_3^- 的净迁移不受影响[71]。这种肠毒素还能导致试验动物出现红疮和增加毛细管的通透性。并出现副拟交感神经性的症状。它对兔回肠的影响可以参阅图 21.3。

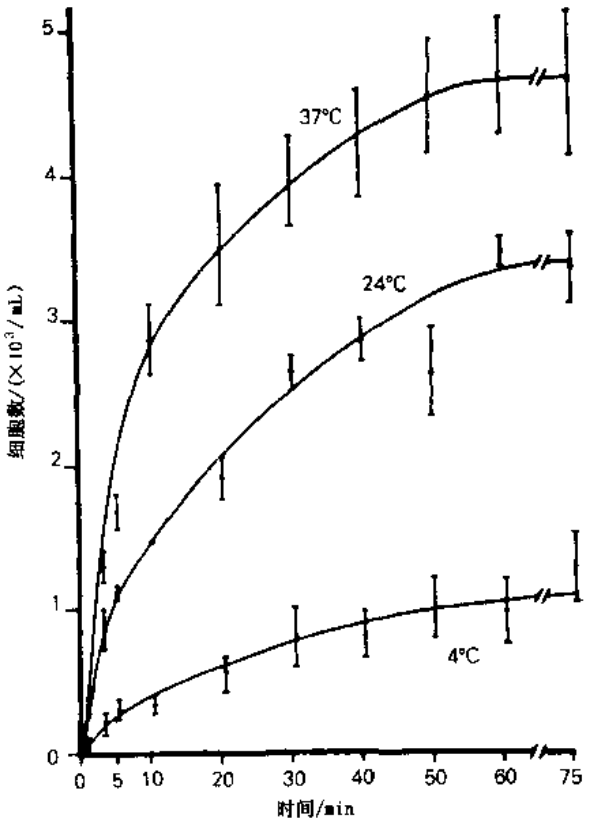


图 21.2 肠毒素与肠细胞专一性结合与温度及时间的关系（^{125}I 标记分析）[72]

注：(1)误差线显示平均标准偏差，当偏差小于符号本身时，则不显示。

(2)资料来源：McDonel[72]，copyright ©1980 by American Chemical Society。

Lindsay 等人[62]报道，产气荚膜梭菌肠毒素的作用是婴儿意外死亡（SID）的病因之一。他们认为由于婴儿的免疫系统处于不成熟的状态，婴儿在死亡的几周之前就已经感染细菌了，在感染过程中，一种刺激物分子从肠膜绒毛端部释放出来。一此实验证据表明这种刺激物分子是（或可能是）γ-干扰素，它是一种导致婴儿细胞对产气荚膜梭菌肠毒素敏感的细胞素[57]。

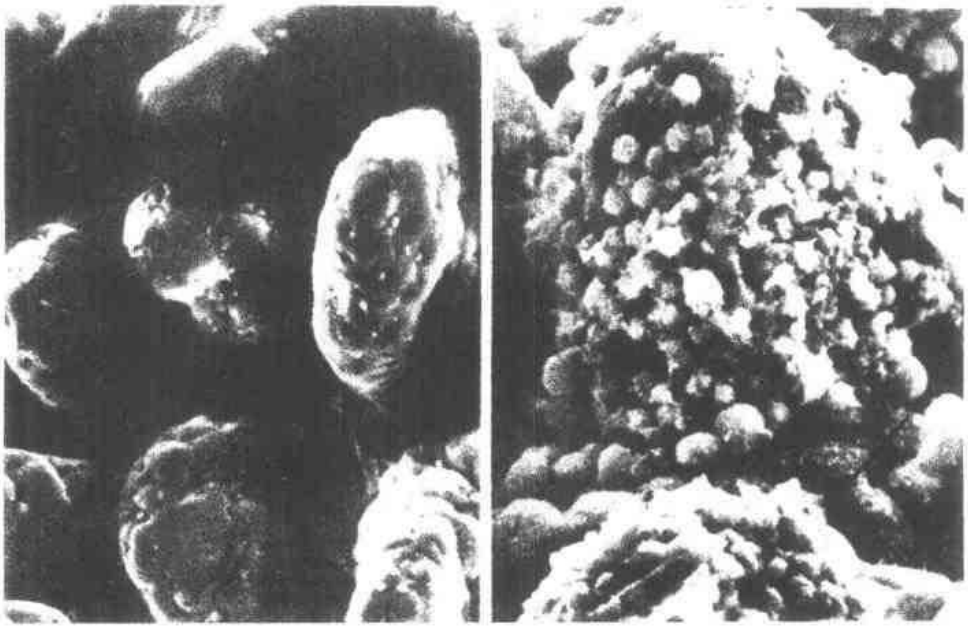


图 21.3　（左图）兔回肠绒毛扫描电镜对照照片（×370），显示肠绒毛的典型形态
（右图）兔回肠绒毛用产气荚膜梭菌肠毒素处理 90min 后的形态（×900），
显示中毒损伤的绒毛端部

21.1.4　含毒食品与中毒综合征

中毒症状可以在摄入污染食品之后的 6～24h 内出现，而多数出现症状的时间是在 8～12h 之后。这种中毒的症状有急性腹痛、腹泻、恶心和发热，而呕吐症状较少。除了老人或抵抗力很弱的人之外，这种中毒的症状延续时间较短，一般在 1d 或更短的时间内。它的致死率很低，发病后也不会出现免疫作用，但是在某些有中毒病史的人体内可以发现这种肠毒素的循环抗体。

产气荚膜梭菌食物中毒的实际发生率尚不清楚。因为这种病症比较温和，所以很可能只是影响到多组人群的爆发和病例时才会有报道和记录。在 1983～1987 年间经过确诊并报告至美国疾病控制中心的病例概括在表 21.2 中。在每一次事件中涉及的平均发病人数约为 100 人。

表 21.2　　美国 1983－1987 年间产气荚膜梭菌食物中毒胃肠炎的发病起数、涉及人数和死亡人数

年　份	发病起数	涉及人数	死亡人数
1983	5	353	0
1984	8	882	2
1985	6	1016	0
1986	3	202	0
1987	2	290	0

注：资料来源 N. H. Bean，P. M. Griffin，J. S. Goulding. and C. B. Ivey. 1990. *J Food Protect*. 53：711～728。

涉及产气荚膜梭菌中毒的食物常常是在前一天制备而在第二天食用的肉类菜肴。这

类食物在烹调时的加热程度往往不足以杀死耐热性的内生孢子，随后当食物冷却下来和重新温热时，其中的内生孢子就可能发芽生长。虽然肉类菜肴是导致这种中毒的最常见的原因，但是非肉类菜肴也可能被肉汁污染。涉及肉类菜肴的场合较多，可能部分是因为这些食品冷却较慢，也可能是因为导致食物中毒的菌株在肉类中的发生率较高。Strong等人[106]发现在美国510种食品中这种细菌的总出现率约为6%。不同食品中产气荚膜梭菌的出现率为：工厂生产的冷冻食品2.7%，水果和蔬菜3.8%，调味品5%，家制食品1.8%，原料肉、家禽和鱼类16.4%。Hobbs等人[41]报道，在被检测的小牛肉、猪肉和牛肉样品中，14%～24%含有耐热性内生孢子，但是17份羊肉样品中不含这种孢子。在日本，肠毒素产生菌株可以从食品加工工具（80份样品中有6%）、牡蛎（41份样品中有12%）和水（20份样品中有10%）中分离出来[91]。

在一起涉及375人的食物中毒事件中，有140人得病，这起事件被证明是由产气荚膜梭菌和鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）引起的[86]。产气荚膜梭菌已被证实可以生长在很多种食品中，对零售的冷冻熟食制品的一项研究发现，该食品有一半为营养细胞阳性，而有15%含有内生孢子[113]。这一组研究者将产气荚膜梭菌接种到肉制品中，在−29℃下储存了42d。虽然在这样的储存条件下孢子的存活率较高，但营养细胞基本上死亡了。Goepfert和Kim[33]研究了生牛肉泥中接种细胞的存活情况，他们发现储存在1～12.5℃温度下时细胞数也会减少。生牛肉中含有自然微生物菌群，上述情况表明产气荚膜梭菌在这样的条件下不能与其它微生物竞存。

21.1.5 预防

产气荚膜梭菌胃肠炎综合征可以采用前面介绍的所有预防食物中毒的措施进行预防。因为这种中毒症常常发生在学校的自助餐厅中，因此应该采取一些特定的措施。在

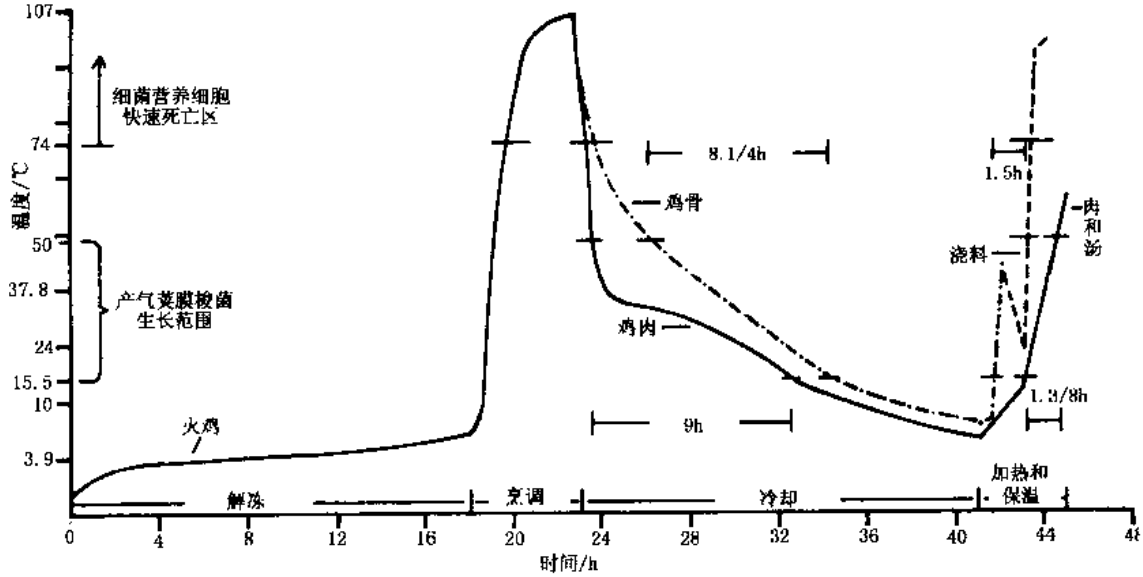


图21.4 一个学校午餐食堂的火鸡制备过程中时间与温度关系图解[19]

注：资料来源Bryan et al.[19]，copyright ©1971 by international Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians。

调查一起导致80%学生和教师中毒的、发生在学校午餐食堂的产气荚膜梭菌食物中毒事件，Bryan 等人[12]绘制了一份时间-温度关系图，以试图确定火鸡是何时、何地和怎样成为含毒载体的（图 21.4）。他们得出的结论是导致中毒的原因是肉和肉汤。而非调料。关于预防这种事件再次出现，这些研究者对于火鸡和调料的制备过程提出了 9 点建议：

①熟调火鸡时，要使鸡肉内部的温度至少达到 74 C，或更高一些更好；

②彻底清洗和消毒所有先前接触过原料火鸡的容器和设备；

③对烹调后的火鸡进行去骨、切片或其它加工操作时要洗净手。并使用可降解的塑料手套；

④冷却前要将火鸡肉与鸡骨分开；

⑤烹调后要尽快冷却火鸡和鸡骨；

⑥使用浅盘盛放鸡骨和去骨的鸡肉，置于冰箱中冷藏；

⑦在制备汤汁或浇料之前要将鸡骨放到沸水中；

⑧将浇料加热至所有部分都达到 74 C 或 74 C 以上；

⑨在即将食用之前将鸡肉块置于汤汁中加热，直到鸡肉大部分达到 74 C 的温度。

21.2 肉毒梭菌食物中毒

产气荚膜梭菌食物中毒，患者必定是摄入了大量的活性菌体细胞，但肉毒梭菌食物中毒与此不同，它是由摄入了肉毒梭菌在食物中生长时产生的毒性极强的可溶性外毒素引起的。

涉及人类肉毒梭菌中毒的最早文献可能是李奥国王六世发布的命令，在公元 886－912 年间禁止食用猪血肠，因为它能危害人类健康，这是马其顿时代拜占庭的法规之一。1793 年发生在德国符腾堡州威尔班德的一起“香肠中毒事件中，有 14 人患病，其中有 6 人死亡。所追查出的病原是猪血肠（由猪肠衣填充猪血和其它配料制成）。这种填充好的猪血肠扎好肠口后，只经过简单煮沸加热和烟熏，之后贮存在室温下。在 1820 1822 年间，Justinius Kerner 研究了发生在符腾堡州的 230 例“香肠中毒”事件，他注意到如果在香肠外加上保护性外套并经过煮沸消毒，则产品不会导致中毒。1986 年，24 名音乐俱乐部的成员食用了腌制生火腿后，有 23 人中毒发病，其中死亡 3 人。根特大学的 Ermengen 调查了这起事件，他发现他们所食用的火腿既未被煮熟，也未被烟熏，从火腿中和患者的脾脏中分离出了同样的微生物。Ermengen 将这种微生物称为肉毒杆菌（*Bacillus botulinus*）。这一菌株后来被归类于 B 型。

肉毒梭菌食物中毒是由某些肉毒梭菌的菌株引起的，它们是革兰氏阳性、厌氧、产孢子的杆形菌，所产孢子为卵形至圆筒形，着生于菌体端部或亚端部。根据它们所产毒素的血清反应的特异性，可以将它们分为 7 种类型：A、B、C、D、E、F 和 G。A、B、E、F 和 G 型菌株也--样能导致人类发病，C 型菌株能导致家禽、家畜、水貂和其它动物发病，而 D 型菌株与食草动物的饲料有关，特别是在南部非洲。这些菌株在分解蛋白质的能力上也有差别。A 型和 G 型菌株，如某些 B 型和 F 型菌株也一样能分解蛋白质。E 型菌株，如某些 B 型和 F 型菌株一样也不能分解（参阅表 21.3）。G 型菌株的蛋白质分解活力要低于 A 型菌株，它的毒性需要胰蛋白酶的增强作用。

表 21.3　　肉毒梭菌菌株及其所产毒素的比较

特　性	血清型						
	A	B	B	E	F	F	G
发现年份	1904	1896	1960	1936	1960	1965	1969
分解蛋白质(+)、不分解蛋白质(−)	+	+	−	−	+	−	+(弱)
组别	I	I	II	II	I	II	IV
主要生态环境	陆地	陆地	水中	水中	水中	水中	陆地
生长最低温度/℃	~10	~10	3.3	3.3	~10	3.3	~12
生长最高温度/℃	~50	~50	~45	~45	~50	~45	无数据
生长最低 pH(见正文)	4.7	4.7	4.7	4.8	4.8	4.8	4.8
生长最低 A_w	0.94	0.94	~0.97	~0.97	0.947	~0.97	无数据
内生孢子加热致死 D 值/℃	D_{110}=2.72~2.89	D_{100}=1.34~1.37	无数据	D_{80}=0.80	D_{110}=1.45~1.82	$D_{82.2}$=0.25~0.84	D_{110}=0.45~0.54
孢子辐射致死 D 值/kGy	1.2~1.5	1.1~1.3	无数据	1.2	1.1;2.5	1.5	无数据
生长最高 NaCl 浓度/%	~10	~10	5~6	5~6	8~10	5~6	无数据
食物中毒相对发生频率	高	高	无数据	海产品中最高	1 起	1 起	无
H_2S 产生	+	+	−	−	+		−+
酪蛋白水解	−	+	−	−	+	−	+
脂肪酶产生	+	+	+	+	+	+	
葡萄糖发酵	−	−	+	+	+	−	−
甘露糖发酵	−	−	+	+		+	
丙酸生成	+	+	无数据	无数据	+	无数据	无数据

注：+为阳性；++为强阳性；　为阴性；~为大约。

所有产生毒素的菌株都可以归类于四个组之一——Ⅰ Ⅱ Ⅲ或Ⅳ。第Ⅰ组含有蛋白质分解酶，第Ⅱ组不含蛋白质分解酶，第Ⅳ组在血清学分类上属于G型。第Ⅲ组由血清C型和D型组成。值得注意的是，可能有2种肉毒梭菌毒素可以在肉毒梭菌之外的菌种中检测出来。F型毒素是由巴拉提梭菌（*Clostridium baratti*）产生的[38]，而一种抗原性质类似但与E型毒素不同的神经毒素是由丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*）产生的[70]。在后一种场合下，毒素基因是由一种有缺陷的噬菌体从产毒素的丁酸梭菌转移到不产毒素的类E型肉毒梭菌中去的，从而使得受体菌株具有感染性[171]。这两种菌的E型毒素基因都位于染色体上。因此只能推测巴拉提梭菌是由类似的机制获得毒素的。这种巴拉提梭菌毒素的分子质量约为1.4×10^{8}u[31]。

21.2.1　肉毒梭菌的分布

这种微生物常栖息在土壤和水中。在美国，A型菌株更多地出现在西部各州的土壤中，而B型菌株更多地出现在东部各州和欧洲的土壤中。据报道，来源于不同国家的土壤和肥料中含有18%A型菌株和7%B型菌株的孢子。在被检测的耕作过的土壤样品中，有7%含有A型菌株和6%含有B型菌株的内生孢子。E型菌株的孢子似乎更多地出现在水中，尤其是海水中。在研究哥本哈根港口的淤泥样品时，Pederson[85]发现84%含有E型菌株的孢子，而来源于城市公园的土壤样品中有26%也含有这种微生物。在研究来源于丹麦、法罗群岛、冰岛、格陵兰岛和孟加拉国的环境样品时发现，90%来源于丹麦的水样和86%来源于格陵兰岛的水样中含有E型菌株[13]。这种菌株未发现在丹麦的土壤和森林地中，而B型菌株存在于这些样品中。根据这些结果，Huss[48]认为E型菌株是真正的水生微生物，它们在死亡的水生动物和沉积物中繁殖扩散，随着水流和鱼类的洄游而传播。E型菌株有时也存在于日本北方海和达连湾边的水中。在1960年之前，人们还不知道五大湖和墨西哥湾海岸的水中存在这种微生物，但是它们在这些水域及其在（美国）缅因州海湾、委内瑞拉地区海湾水域中的存在现在已经研究得较多。俄罗斯的土壤样品中也发现有肉毒梭菌存在，其中以E型菌株占多数。

对于肉毒梭菌在土壤中的总发生率，有人认为每克土壤中的平均数量不足1个。非蛋白质分解型的菌株与水的关系要比与土壤的关系更为密切，从表21.3中可以看出这些菌株在1960～1969年间的发生率。这后一种情况可能是非蛋白质分解菌株耐热性较差的结果，它们在样品经历筛选孢子的常规加热处理过程中可能被杀死。

F型菌株最早是由Moller和Scheibel[79]从被怀疑是肉毒梭菌中毒病因的家制肝酱中分离出来的，这起事件发生在丹麦朗厄兰岛，导致了1人死亡。在此之后，Craig和Pilcher[25]从哥伦比亚河中捕捉的大麻哈鱼中分离出了F型菌株的孢子，Eklund和Poysky[34]也从美国俄勒冈州和加利福尼亚州的海边的水底淤泥中发现了F型菌株的孢子，Williams-Walls[170]从弗吉尼亚州的约克河捕捞的螃蟹中分离出了两株分解蛋白质的菌株，Midura等人[75]从加利福尼亚的野牛肉干中也分离出了这种菌株。

G型菌株最先是1969年从阿根廷的土壤样品中分离出来的[32]，后来从瑞士的3具人尸体中分离出来[101]。这些死者与食物并没有关系。至今人们仍认为这种死亡不是由于食物中毒，因为这种菌株产生的神经毒素的量要比A型菌株少得多。有实验表明，G型

菌株在培养基中只产生 40 LD_{50}/mL 毒素，而在同样的培养基中 A 型菌株可以产生 10^5～10^6 LD_{50}/mL 毒素，但是在某些条件下，G 型菌株经过诱导也可以在培养基中产生高达 90×10^4 LD_{50}/mL的毒素[143]。

关于多数肉毒梭菌孢子在土壤和其它环境样品中的分布，可以参阅参考文献[148]。

21.2.2 肉毒梭菌菌株的生长

能导致人类中毒的肉毒梭菌的生长特征和某些其它特征概括在表 21.3 中。下面讨论重点放在分解蛋白质菌株和不分解蛋白质菌株的差别方面，而不是在血清型方面。分解蛋白质菌株与不分解蛋白质菌株的不同点在于，它们可以消化酪蛋白而产生 H_2S。另一方面，后者可以发酵甘露糖，而分解蛋白质菌株不能发酵甘露糖。分解蛋白质菌株与不分解蛋白质菌株都能生成单独一组针对细胞的抗原，这些抗原可以用凝聚反应进行检测[149]。每组中的每种抗原对抗血清的吸收都会从该组所有 3 种抗原上移走抗体。

这些微生物的营养需求是复杂的，需要氨基酸、B 族维生素和无机盐。能支持它们生长和产生毒素的合成培养基已经设计出来。分解蛋白质菌株在碳水化合物中的生长并不是很有利，而这种培养基对于不分解蛋白质菌株比较有利。另外在碳水化合物培养基中，不分解蛋白质菌株的发酵力也较强。

分解蛋白质菌株一般在 12.5 C以下不能生长，但是有些报道称，在 10 C下这些菌的生长可以被检测出来。对于 A 型菌株和分解蛋白的 B 型菌株，以及可能存在的其它分解蛋白质的菌株，其生长的上限温度约为 50 C。另一方面，不分解蛋白质的菌株可以在低达 3.3 C的环境下生长，而最高生长温度约比分解蛋白质的菌株低 5 C。这些菌株的最高和最低生长温度也与其它生长参数有关，已经报道的最低和最高生长温度可能是在其它条件（如 pH、A_w 等）都是最适宜条件下测定的。在一份对于肉汤和蟹肉中不分解蛋白质的 B 型和 F 型菌株生长和产毒的研究中发现，在肉汤中于 4 C下就可以生长和产毒，而在蟹肉中只有在 26 C以上才能生长和产毒，在 12 C或低于 12 C时则不能生长和产毒[96]。在这种肉汤和蟹肉中，1 株 G 型菌株可以在 12 C下生长和产毒，而在 8 C则不能生长和产毒[150]。

肉毒梭菌生长和产毒的最低 pH 是许多研究的主题之一。一般认为，它们在 pH4.5 或低于 pH4.5 下不能生长，根据这一点可以考虑食品 pH 低于这一水平时进行热处理的强度（参阅第五部分 16）。由于肉毒梭菌毒素在某些高酸度的家制罐头食品中存在，因此这一领域也是目前研究的课题之一。在一份研究中，A 型和 B 型菌株在 pH4.8 左右的番茄汁中未见生长，但是当产品接种美丽曲霉（*Aspergillus gracilis*）之后，毒素在 pH4.2 条件下与霉菌的菌丝盖一同生成[82]。在另一份对于初始 pH 为 5.8 的番茄汁的研究中发现，霉菌菌盖下方的 pH 在 9d 之后升高到了 7.0，而在 19d 之后升高到了 7.8[125]。将番茄汁接种 A 型肉毒梭菌孢子、一种枝孢霉（*Cladosporium*）和一种青霉（*Penicillium*）后进行培养，结果发现最上层的 0.5mL 培养物的 pH 在 9d 和 19d 后分别从 5.3 升高到 6.4 和 7.5。在番茄汁中一株 B 型菌于 pH5.24 条件下 30d 后和 pH5.37 6d 后均产生了气体。在由全虾、虾汁、番茄汁和番茄组成的食物体系中，用醋酸或柠檬酸将番茄汁和虾汁分别

酸化至 pH4.2 和 4.6 时，在 26℃下保藏 8 周之后，3 株 E 型菌株均未见生长或产生毒素[87]。但是在只用柠檬酸而不用醋酸控制培养液的 pH 时，1 株 E 型菌在 pH4.20 和 26℃下于 8 周后生长并产生毒素[114]。一般来说，分解蛋白质的菌株和不分解蛋白质的菌株的最低生长 pH 是相近的。

在大豆蛋白水悬浮液中接种 4 株 A 型菌和 2 株 B 型菌于 30℃培养时，在 pH4.2、4.3 和 4.4 条件下生长[94]。接种 5×10^6 孢子/mL 后，在用盐酸或柠檬酸调节 pH 的情况下，在 pH4.4 下培养需要 4 周才能检测出毒素。当采用乳酸或醋酸调节 pH 时，在 pH4.4 分别需要 12 周和 14 周才能检测出毒素。接种 $10^3\sim10^4$/g 肉毒梭菌孢子后，这些细菌在食物中的存在数量要比食物中自然存在的微生物数量多得多（见下述）。在接种大量的孢子后，这些菌可以在 pH 低于 4.5 的条件下生长，这一点与人们普遍认为的这些微生物在低于 pH4.5 的条件下不能生长的观点不符，但在食品中接种孢子量很少时，这些菌在 pH4.5 以下确实难以生长。

在 pH、NaCl 和生长温度相互作用的关系方面，对日本面条调料的一项研究发现，接种 A 型菌和 B 型菌孢子后，在下述几种情况下没有毒素生成：

①pH＜6.5、4%NaCl、20℃；

②pH＜5.0、1%NaCl、30℃；

③pH＜5.5、3%NaCl、30℃；

④pH＜6.0、4%NaCl、30℃[46]。

A 型菌和分解蛋白质的 B 型菌允许生长的最低 A_w 为 0.94。这个数据似乎得到了很好的证实。E 型菌的最低 A_w 为 0.97。虽然所有的菌株并未在相同的条件下进行试验，但是其它菌株的生长最低水分活度值与 E 型菌是接近的。培养基中水分活度的控制方法影响到最低水分活度值的测定结果。当采用甘油作为保湿剂时，所测定的最低 A_w 值要比采用 NaCl 或葡萄糖的低一些[102]。当 NaCl 含量为 10%或蔗糖含量为 50%时，会抑制 A 型菌和 B 型菌的生长。3%～5%的盐会抑制烟熏白鲑鱼产生毒素[13]。在亚硝酸盐存在的情况下，所需要的盐含量就更低（参阅第五部分 13）。

在耐热性方面，分解蛋白质的菌株比不能分解蛋白质的菌株耐热性要强得多（表 21.3）。虽然表中的数据表明 A 型菌株比较耐热，其次是分解蛋白质的 F 型菌株，再其次是分解蛋白质的 B 型菌株，但是这些数据仅仅是一种典型的情况，加热介质、菌株的培养史以及其它一些因素，都已知能影响菌株的耐热性（参阅第五部分 16）。表 21.3 的数据都是在磷酸盐缓冲液中测定的。在 E 型菌株中，阿拉斯加和贝鲁加的菌株似乎比其它菌株都更为耐热。在绞碎的白鲑鱼中，据报道它们的热致死值 $D_{80℃}$ 为 2.1 和 4.3[17]，而在螃蟹肉中，它们的热致死值 $D_{82.2℃}$ 分别为 0.51 和 0.74[66]。对于烟熏白鲑鱼制品，加热至内部温度达到 180℃维持 30min 后，产品为无毒状态[26]，而在另一项研究中，经过同样方法处理的 858 份新近烟熏的白鲑鱼制品有 10%或 1.2%遭受了污染，其中多数是 E 型菌株污染[86]（细胞内生孢子的热致死性质请参阅第五部分 16）。

阿根廷和瑞士的 G 型菌株都可以产生两种类型的孢子，不耐热的和耐热的孢子。不耐热的孢子可以在 80℃下 10min 被杀死，这种类型孢子在瑞士菌株培养物所产生的孢子中占 99%，在阿根廷菌株中，每 10 000 个内生孢子中只有 1 个是耐热的[65]。两种耐热菌

株在磷酸盐缓冲液中的热致死值 $D_{100℃}$ =0.45～0.54min，而两株不耐热菌株的热致死值 $D_{82.2℃}$ =1.8～5.9min[65]。更为耐热的 G 型菌株孢子至今还未见到。

与热效应不同的是，辐射似乎对分解蛋白质菌株和不分解蛋白质菌株的内生孢子的作用比较类似，据报道的辐射致死的 D 值为 1.1～2.5kGy（参阅第五部分 14）。但是，1 株不分解蛋白质的 F 型菌株被检出的 D 值为 1.5kGy，这与 A 型菌株的 D 值接近，但是 1 株分解蛋白质的 F 型菌株的 D 值只有 1.16kGy[55]。

21.2.3 肉毒梭菌生长与生态

在有大量其它竞争性微生物存在的情况下，肉毒梭菌似乎不能生长和产生毒素。含毒食物一般不含有其它类型的微生物，因为它们经过了加热处理。但是据报道，在酵母存在时，肉毒梭菌在 pH 低至 4.0 时可以生长并产生毒素。然而据报道，梭状菌与乳酸菌之间存在着拮抗作用，乳酸菌能够抑制肉毒梭菌的生长和产毒，间接的证据有牛乳中不存在梭状菌毒素。据认为，酵母可以产生使梭状菌在低 pH 条件下生长的生长因子，而乳酸菌可以降低氧化还原电位有助于梭状菌生长或施加“拮抗效应”抑制它的生长（见第第二部分 3）。在一项研究中，A 型肉毒梭菌受到了从土壤中分离的生孢梭菌（*C. sporogenes*）、产气荚膜梭菌（*C. perfringens*）和蜡状芽孢杆菌（*B. cereus*）的抑制[106]。某些产气荚膜梭菌可以生成一种抑制因子，这种因子可以作用于 11 株 A 型菌、7 株分解蛋白质的 B 型菌和 1 株不分解蛋白质的 B 型菌、5 株 E 型菌和 7 株 F 型菌[50]。某些罐头食品中存在凝结杆菌（*Bacillus coagulans*）时，即使 pH 小于 4.5，肉毒梭菌孢子也可在其中发芽和生长。在一项 pH4.5 的番茄汁中接种凝结杆菌的研究中，35℃下经过 6d pH 上升到了 5.07，而在 21d 后上升到了 5.40，这样就使得肉毒梭菌可以生长[4]。Kautter 等人[50]发现 E 型菌株可以被其它形态和生化特征类似于 E 型菌株的其它非产毒微生物所抑制。这些微生物能产生一种类似于底物的细菌素（称为细菌素 E）对 E 型菌株施加抑制作用。在一项更细致的研究中，人们发现分解蛋白质的 A、B 和 F 型菌株对非产毒 E 型菌株释放的细菌素 E 有抗性，但是产毒的 E 型菌株细胞对细菌素 E 敏感[3]。据发现，对于不分解蛋白质的 B、E 和 F 型菌株和非产毒的 E 型菌株，这种细菌素是孢子抑制剂。

真空包装的食品（如咸肉）可以支持肉毒梭菌的生长和产生毒素，但并不会导致食品风味的显著败坏，A 型和 E 型菌株的孢子可以在烟熏的鱼中生长并产生毒素[111]。A 型菌株接种到鱼中之后会导致严重的败坏，而 E 型菌株导致的败坏程度较轻。分解蛋白质的菌株一般会比不分解蛋白质的菌株产生较多风味不良的副产物。在一项对火鸡卷中 E 型菌株生长和毒素形成的研究中，E 型菌株的孢子在 30℃时发芽后，24h 内产生了毒素[74]。2 周之内，毒素的生成与细胞的生长是同步的，在此之后毒素生成所延续的时间更长。这些发现表明，在食品中不存在 E 型菌株活性细胞的情况下，仍然可以发现 E 型菌株毒素。在培养 56d 之后却检测不到毒素。在另一项研究中，研究者在真空包装、充氮或包装的新鲜鳕鱼、芽鳕或比目鱼片中接种了 5 株 E 型肉毒梭菌孢子，在 26℃储存 1～3d 之后，所有的被试物中都产生了毒素，此时产品在感官上也已令人难以接受[84]。将鳕鱼片放在 4℃下储存时，当感官性质还没有发生明显变化时，已经可以检测到

毒素。

在对储存在真空容器中的生马铃薯切片的实验研究中，发现 A 型和 B 型菌株可以在其中产生毒素[97]。当马铃薯切片不用亚硫酸钠浸泡处理而在 22℃下储存时，3d 之后便发现毒素生成和风味败坏，但是当用亚硫酸盐浸泡处理后，4d 之后可以检出 A 型菌株毒素，而这时的马铃薯片在感官上还可以接受。在美国科罗拉多州，有两起肉毒梭菌食物中毒的毒素载体是马铃薯沙拉[51]。这种产品在家庭中是温热食用的，在剩余的菜肴中可以发现 A 型菌株毒素。

一份关于 F 型菌株的生态学的报告表明，这类菌株在所调查年份的某段时间内不存在于淤泥样品中，这可能与当时该样品中地衣芽孢杆菌（*Bacillus licheniformis*）的存在有关，这段时间内地衣芽孢杆菌明显抑制了 F 型菌株[117]。

21.2.4 真空加工食品和有关的食品产品

肉毒梭菌菌株在真空加工食品中的生长和产生毒素是人们特别关心的问题。食品的真空加工是 1980 年左右在法国发展起来的方法，这种方法是将食品原料装在严格密封的袋中，并在真空下加热。在这样的条件下只是多数或所有营养细胞被杀死，而细菌孢子可以存活下来。这样，真空加工的食品是含有细菌孢子的食品，而且孢子处在厌氧和无竞争微生物的环境中。在肉类、家禽和海产品等低酸食品环境中，肉毒梭菌的孢子可以发芽、生产并产生毒素。加热温度和时间是两个必须慎重监测的参数，以避免食品产品产生毒素。

虽然分解蛋白质的菌株在冷藏的温度范围内并不生长，但是不分解蛋白质的菌株能够生长。一份已发表的关于肉毒梭菌孢子在肉类和家禽中的发生率的文献表明，这些食品中的细菌数是很低的，远低于 1 个孢子/g（表 21.4）。如果平均孢子数为 1 个/g，并在恒定的 3～5℃下储存，可以预测真空加工的低酸肉类制品至少在 21d 内是安全的。将 E、B 和 F 型的 13 株菌混合接种到生岩鱼切片中，使每份样品中的孢子数为 1 个，在 4℃储存 21d 后未检出毒素[56]，进行这种试验的红真鲷鱼匀浆样品在 4℃储存 21d 后也未检出毒素[56]。将气调包装的猪肉接种后在 5℃储存，44d 后未检出毒素[58]。不论储存时间长短，在恒定温度冷藏时，温度的波动都会缩短贮藏时间。具有二级保护（例如 A_w<0.93 或 pH<4.6）的产品即使在温度波动的情况下也可以安全地贮藏较长时间。因为芽孢杆菌的孢子数可能比肉毒梭菌孢子的大，并且因为前者可以在 pH<4.6 条件下生长，所以不难相信这些细菌能够在温度波动的情况下发芽、生长和使 pH 升高。当初始 pH 低于 4.5 的面条储存在厌氧条件下时，由于微生物的生长导致 pH 升高后可以检出肉毒梭菌毒素[14]。虽然现在普遍认为鱼类比陆地动物含有更多的肉毒梭菌毒素并且需要给予更多的重视，但是在一份最近对真空包装鲜鱼的研究中，1074 份样品在 12℃维持 12d 后未发现有肉毒梭菌毒素产生[66]。在对照样品中，接种的 E 型菌株生长，这说明要么这些样品中不含有肉毒梭菌孢子，要么这种菌被其它菌群所抑制。

表 21.4 14年间肉毒梭菌在肉类和家禽中的发生率

国家	产品	阳性数/检测数	肉毒梭菌	
			类型（菌株数）	菌数/g
英国	咸肉	36/397	A[23] B[13]	0.00217
美国	熟火腿	5/100	A[5]	0.00166
	烟熏火鸡	1/41	B	0.0081
	其它肉类	0/231	—	--
	法兰克福香肠	1/10	B	0.0066
	其它肉类	0/80	-	--
	午餐肉	1/73	B	0.0057
	“香肠”	0/17	--	
美国、加拿大	牛鸡肉	1/1078	C	0.0031
	生牛肉、猪肉	0/1279	—	--
加拿大	肉片	0/436	-	—

注：资料来源 Tompkin[1]。

有几组研究者采用了数学模型来预测真空加热生产和气调包装食品中细菌生长和毒素产生的可能性。采用多因素设计的这些模型可以对温度、A_w、pH、接种量和储存时间等因素的单独影响和相互作用效应进行综合评价。经过一系列的研究所建立的数学公式可以用于预测毒素产生的时间及单独一个孢子在指定的马铃薯烹调和真空包装条件下毒素生成的可能性[19]。在后一项研究中，5株A型和B型菌株孢子的每次反应都显示是线性的，而对于A_w的变化，上述反应则是曲线形的。另一份对于采用气调包装鲜鱼的系列研究结果为，在最终多重线性衰减模型中储存温度占了实验参数变化的74.6%，而孢子数量只占7.4%[75]。在20℃下毒性出现的最早时间是在1d后，但是在4℃下这个时间延长到了18d。E型菌株孢子在肉泥培养基中于3℃下170d内未观察到其生长，但是在真空包装的青鱼中接种E型菌株孢子10^4/g后，于3.3℃下21d后检出了毒素的生成[76]。在其它所报道的数学模型中还包括了浓度高达2270mg/kg抗坏血酸及其它一些参数的联合作用。

21.2.5 肉毒梭菌神经毒素的性质

这种神经毒素是在细菌体内形成的，在菌体自溶时释放出来。它们是由生长在最佳条件下的细胞产生的，但是也有休眠细胞产生毒素的报道。肉毒梭菌毒素是已知毒性最强的毒素，据报道纯化的A型毒素的半数致死能力为3×10^7只鼠/mg。据报道鼠类静脉注射或腹膜注射的最低致死剂量为0.4～2.5ng/kg，50%人体的致死剂量约为1ng/kg体重。这些毒素中最先被纯化的是A型毒素，它都是由Lamanna等人和Abrams等人在1946年纯化的。B、E和F型毒素现在也都已纯化成功。

A、B、E和F型肉毒梭菌神经毒素的基因是线粒体基因，而G型毒素的基因是细胞

质基因[129]。G 型毒素产生菌株有别于其它肉毒梭菌菌株，因此将它们归类于第Ⅳ组是合理的。B 型肉毒梭菌神经毒素基因的顺序已被确定，而且已经被克隆出来[118]。

肉毒梭菌神经毒素有 4 种不同大小的分子——7S、12S、16S 和 19S，它们的分别被称为 L、M、L 和 LL 型分子。12S 或 M 型（中型分子）毒素最常出现在食品中。L 型（大型分子）毒素是 S 与无毒部分的复合物。它们的相对分子质量为：M＝300 000、L＝500 000、LL＝900 000。LL 只在 A 型菌株中被发现。M 型和 L 型毒素和其它毒素前体在分裂后变成衍生物或 S 毒素。关于更详细的信息请参阅第六部分 18。

在呈现神经毒性作用之前，肉毒梭菌毒素必须首先结合到神经组织上，尤其是结合到神经节苷脂受体上。对于毒素的结合，神经节苷脂中内部半乳糖上必需有两个唾液酸残基，神经节苷脂上非还原端的另一个唾液酸也有助于毒素的结合[21]。在结合完成之后，这种毒素通过神经前突阻止乙酰胆碱从副拟交感神经末梢的释放来显示它的毒性作用。

据报道 A 型毒素比 B 型或 E 型毒素致死能力更强。与 B 型毒素相关的死亡率比 A 型毒素的死亡率要低得多。在 B 型毒素中毒的情况下，即使被证实血液中毒素的含量相当高，患者仍然有可能康复。

肉毒梭菌中毒综合征可以由口服毒素或非胃肠道途径给毒而发生。它们可以通过呼吸系统黏膜和胃肠壁吸收后进入血液。这些毒素不能完全被胃蛋白酶水解而失活，事实上那些由不分解蛋白质的菌株产生的毒素反而会被激活。分子质量大的复合体或毒素前体对酸和胃蛋白酶有较强抗性[108]。在试管中的试验中，虽然衍生的毒素很快失活，但是毒素前体显示出对鼠肠道液有抗性。这种前体在鼠胃中较为稳定，前体中的非毒性部分似乎对毒素活性提供了保护作用。在肉毒梭菌毒素被吸收进入血液之后，它们可以进入周围神经系统而对神经系统呈现毒性。

肉毒梭菌毒素和葡萄球菌肠毒素与其它导致食物中毒的耐热性毒素不同，它们对热敏感，在 80℃加热 10min 或煮沸几分钟后就可以被杀死。

21.2.6 成人中毒综合征：发生率和含毒食品

肉毒梭菌中毒可以在摄入含毒食品后 12～72h 内出现中毒症状。更长的潜伏期也是有可能的。中毒的症状包括恶心、呕吐、疲劳、眩晕、头痛、皮肤干燥、口干和喉干、便秘、发热、肌肉麻痹、视觉出现双影，最后会停止呼吸和死亡。中毒的症状可以延续 1～10d 或更长的时间，具体取决于患者的抵抗力和其它因素。中毒的致死率在 30%～65% 之间。而欧洲国家的致死率一般要低于在美国的致死率。所有的中毒症状都是由外毒素引起的，治疗方法包括尽快注射特异性抗血清。虽然一般认为口服含毒食品会导致毒素经过口腔吸收，但 Lamanna 等人[58]发现当通过胃管输入而不经过口腔时，老鼠和猴子对毒素更为敏感。肉毒梭菌毒素是神经毒素，能够可逆地与神经细胞结合。采用抗血清的早期治疗可以减轻中毒症状。

在 1963 年之前，美国发生的多数肉毒梭菌食物中毒事件被查出与家制罐头食品有关，它们是由 A 型和 B 型毒素引起的。在 1899～1967 年间报道的 640 起病例中，约有 70% 的病例未鉴定出载毒的食品。在这 640 起病例中，17.8% 与蔬菜有关，4.1% 与水果有关，3.6% 与鱼有关，2.2% 与调味品有关，1.4% 与肉和家禽有关，1.1% 与其它因素

有关。美国在1975—1994年间所报道的肉毒梭菌食物中毒事件如图21.5所示。1977年的一起较大事件发生在密歇根州蓬提阿克市一家餐馆中，患者是在食用一道用家制罐头加工的热沙司之后中毒的。这起事故中未发生死亡事件，鉴定结果是B型毒素中毒。在美国，所有原因的肉毒梭菌中毒事件每年很少超过50起，而发病率最高的10年是在1930—1939年间，当时有384起来自非商品食品中毒的事件报道。在1899—1963年间，有1561起来自非商品食品中毒的事件报道，而在1906—1963年间来自商品食品中毒的事件报道有219起，其中1963年就有24起。

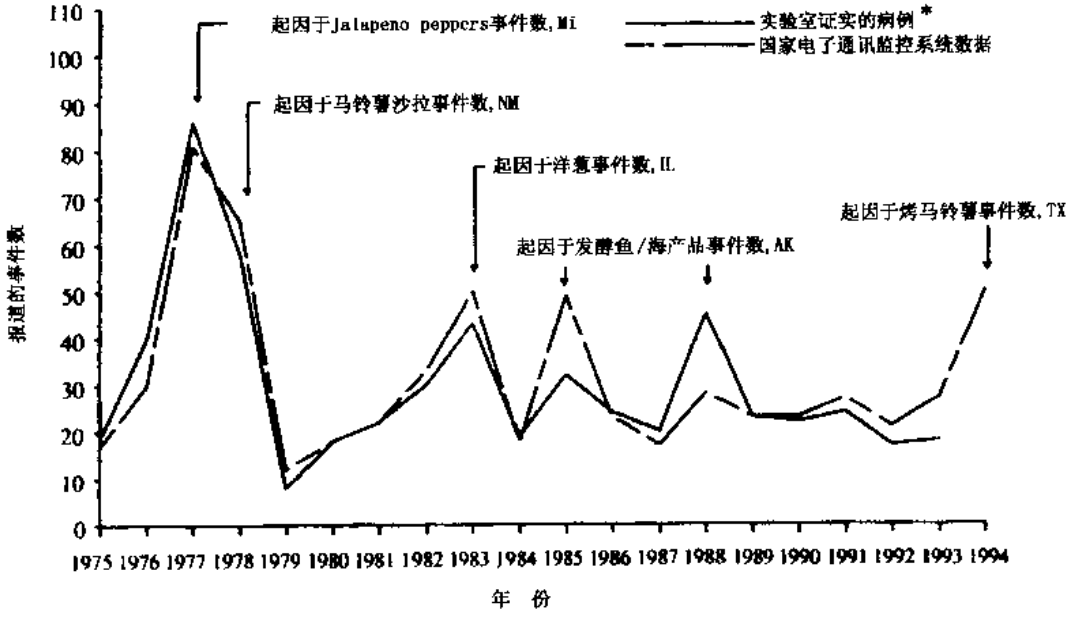


图21.5 美国1975—1994年间发生的肉毒梭菌食物中毒[58]

注：(1) * 未包含1994年的数据。

(2) 资料来源：*US. Centers for Disease Control and Prevention*. 1995. Morb. Mort. Wkly. Rept. 15。

在1963年全年已经证实是E型菌中毒的404起事件中，有304起（75%）发生在日本。日本在1951年之前没有关于肉毒梭菌中毒事件的记载。从1951年5月至1960年1月的一段时间内，所记载的中毒病例有166起，其中有58人死亡，死亡率达35%。据调查，这些中毒事件的多数是由一种家制混合发酵食品引起的，这种食品是将生鱼、蔬菜、米饭混合后加上曲种发酵，发酵醪中加有少量的盐和醋。这种食品密封在带有盖子的木筒中，经过3周以上的乳酸发酵。在这一发酵过程中，氧化还原电位降低，从而容许厌氧菌生长。

在1899—1973年间所记载的来自商品食品的肉毒梭菌食物中毒事件有62起[54]，其中在1930年之前的有41起。在1941—1982年间，美国发生了7起涉及商品金属罐头食品的肉毒梭菌中毒事件，其中发病人数为17人，死亡8人[81]。这些事件中有3起是由A型菌株引起的，其余是由E型菌株引起的。在5起中毒事件中，出现了罐头渗漏或加热不充分的情况[81]。蘑菇罐头据认为是几起肉毒梭菌中毒事件的原因。在1973—1974年间

的研究中，发现有30种蘑菇罐头含有肉毒梭菌毒素（其中29种含的是B型毒素）。另外11种罐头中含有肉毒梭菌的活性孢子，但未产生毒素[64]。商品蘑菇（二孢蘑菇 *Agaricus bisporus*）有支持肉毒梭菌孢子生长的能力，Sugiyama 和 Yang 对这一能力进行了研究[110]。在接种蘑菇的不同部分之后，它们将培养瓶用塑料膜封口并进行培养。当试样在20℃下培养时，最早可以在3～4d之后检测出毒素。虽然封口的塑料膜能容许气体的交换，但是新鲜蘑菇的呼吸作用能以比 O_2 进入得快的速度消耗 O_2，当产品在冷藏温度下储存时，未检出毒素。

1985年在加拿大、荷兰和美国三个国家发生了36起意外的食物中毒事件，致病的含毒食品是包装在玻璃瓶内的浸泡有大蒜泥的大豆油。虽然标签中说明要在冷藏的条件下储存，但是这些未开封的产品在未冷藏的条件下储存了8个月。这些产品被用来制作大蒜泥馅面包，这种面包后来又被用于制作牛肉三明治。这些食品中被发现有能分解蛋白质的B型菌株的孢子，当在装有大蒜泥的瓶中接种分解蛋白质和不分解蛋白质的B型菌株，在25℃培养2周之后，则发现产生了毒素[103]。当在装有大蒜泥的瓶中接种1个孢子/g，在培养20d后，A型菌株毒素已经产生，B型菌株毒素也在20d内产生[98]。在这后一项研究中，虽然瓶中含毒量很高，但产品的外观和气味还是可以被接受的。1991年在埃及发生了91例中毒事故，其中有20人死亡，所分析出的含毒食品是未除去内脏的盐渍的鲜鱼[77]。

在所报道的肉毒梭菌食物中毒事件中，有一起是由于家制肝酱中含有F型毒素引起的，它导致了5人患病，其中1人死亡。美国1966年由于家制鹿肉干导致的中毒事件引起了3人发病[75]。

肉毒梭菌食物中毒最多来自于家制食品和家制罐头食品，其原因是这些食品加工不当或加热条件不足以杀死肉毒梭菌的孢子。这些食品一般不经过再次加热就直接食用。最好的预防措施是将可疑的食品在沸水中加热数分钟，以彻底消除其中的神经毒素。

21.2.7 婴儿肉毒梭菌食物中毒

这种中毒最早是1976年在美国加利福尼亚被报道的，在此之后美国的多数州和许多其它国家都证实了有婴儿肉毒梭菌食物中毒事件发生。在成人的中毒事件中，摄入的是有活性的毒素，而婴儿中毒往往是摄入了肉毒梭菌的活性孢子，当孢子到达肠道中发芽时，毒素就产生了。虽然在某些成人中毒的情况下，肉毒梭菌的内生孢子可以发芽并产生少量的毒素，但成人肠道的环境并不利于孢子的发芽。1岁以上的儿童一般未有这种症状发生，因为他们的肠道内已经建立起了正常的肠道菌群。某些婴儿的发病症状比较温和，而另一些可能症状较重。在中毒的急性发病阶段，婴儿的粪便中可以检出大量的病菌孢子，随着病人的康复，孢子的检出数量会逐渐减少。

这种病症可以由检测婴儿粪便中肉毒梭菌毒素和用老鼠致死率试验进行诊断。因为艰难梭菌（*Clostridium difficile*）也能在婴儿的肠道内产生鼠致死毒素，所以有必要对这种毒素与肉毒梭菌毒素进行区分[30]。

婴儿是从他们的婴儿食品中和可能的环境中摄入活性孢子的。含有孢子的食品可能是那些未经过严格加热而杀死孢子的食品，2种最常见的食品是糖浆和蜂蜜。在检验的90

份蜂蜜样品中，有 9 份样品含有活性孢子。将这些蜂蜜喂给婴儿之后，有 6 份样品导致了婴儿出现中毒症状[76]。在这 9 份样品中，有 7 份是 B 型菌株感染，2 份是 A 型菌株感染。在抽查的 10 类产品中的 910 份婴儿食品中，仅有两类含有肉毒梭菌孢子：蜂蜜和玉米糖浆[51]。在 100 份蜂蜜样品中，有 2 份含有 A 型菌株孢子，40 份玉米糖浆样品中有 8 份含有 B 型菌株孢子。在加拿大，150 份蜂蜜样品中，含有肉毒梭菌孢子（A 型）的只有 1 份，在 40 份谷物干粉样品中含孢子（B 型）的也只有 1 份，而 43 份玉米糖浆样品都是阴性[48]。美国在 1994 年全年中所报道的中毒病例如图 21.6 所示。1982 年发生在 2～48 周婴儿中的 62 起病例涉及的 A 型和 B 型菌株相等。在意大利罗马最先报道的两起病例是由 E 型毒素引起的，这种毒素是由丁酸梭菌（*Clostridium butyricum*）产生的[16]。

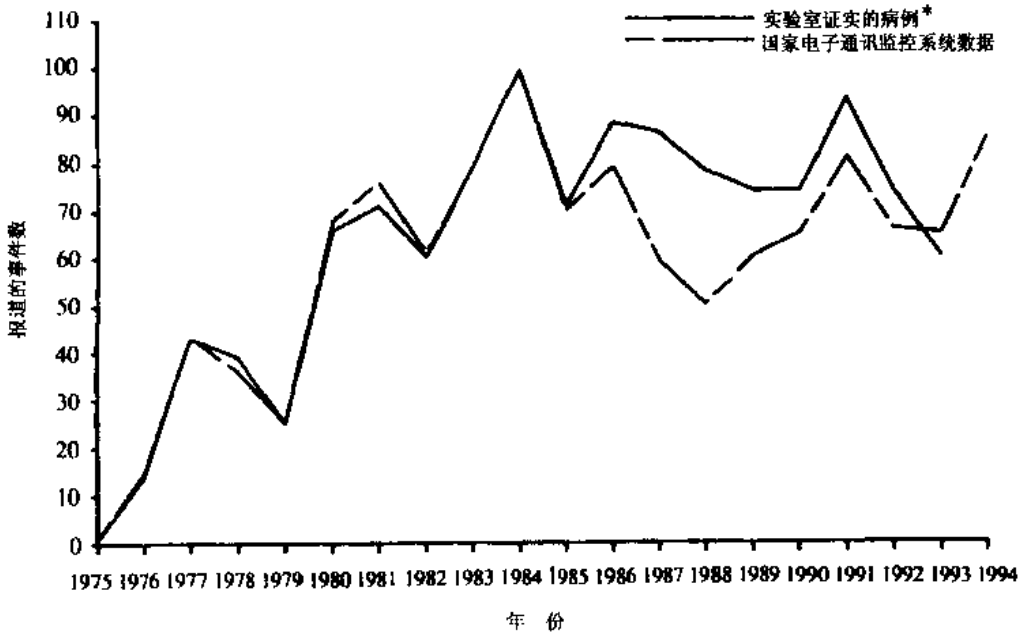


图 21.6 美国 1975～1991 年间婴儿肉毒梭菌食物中毒食物[51]

注：(1) * 不包含 1994 年数据。

(2) 资料来源：*US. Centers for Disease Control and Prevention*. 1995. Morb. Mort. Wkly. Rept. 45。

人们采用了动物模型对这种中毒症状进行了研究，试验动物用的是 8～11d 龄的老鼠[109]和 7～13d 龄的白鼠[78]。在鼠动物模型中，丁酸菌毒素被发现产生于大肠内腔，这种毒毒与回肠无关（关于这种动物模型的敏感性可以参阅第四部分 12）。

21.3 蜡状杆菌胃肠炎

蜡状杆菌（*Bacillus cereus*）是一种好氧产孢子的杆形菌，它们正常地存在于土壤、灰尘和水中。在欧洲，它们至少自 1906 年以来就与食物中毒有关。最早报道这一病症的是 Plazikowski，他的发现在 20 世纪 50 年代初得到了欧洲一些研究者的证实。美国第一次报道这种病例是在 1969 年、英国最早是在 1971 年。

蜡状杆菌的最低生长温度约为4～5℃，最高生长温度约为48～50℃。允许生长的pH值范围为4.9～9.3[34]。它们的孢子具有其它嗜温菌典型的耐热性。

21.3.1 蜡状杆菌毒素

导致食物中毒的菌株可以产生下述毒素和细胞外产物：卵磷脂酶、蛋白酶、β-内酰胺酶、神经鞘髓磷脂酶、蜡状杆菌溶血素（鼠致死毒素，溶血素Ⅰ）和溶血素BL。蜡状杆菌溶血素是一种类似于荚膜梭菌溶血毒O的硫醇激活的毒素。它的分子质量为5.5×10^4u，这种毒素不会导致食物中毒胃肠炎综合征。

中毒以后的致腹泻综合征是由溶血素BL（HBL）引起的，这是一种由B、L_1和L_2分子组成的三分体复合物。这种复合物可以同时呈现溶血、溶解细胞、改变脉管通透性和肠毒素活性。在蜡状杆菌导致眼内炎的情况下，溶血素BL占了视网膜毒性来源的50%[35]。虽然没有证实有单独的肠毒素存在，但溶血素HBL是致腹泻综合征的病因[36]。

不论致腹泻的特定物质是什么，它们都是在指数生长期产生的，而在生长平衡期开始时的毒素浓度最大[37]。要使毒素活性可以检出，所需要的细胞浓度大为10^7/mL。生成毒素的有利pH范围为6.0～8.5。几份乳品样品中的菌株可以在6～21℃下产生毒素[37]。

产生肠毒素的蜡状杆菌菌株已从很多种食品中分离来，在原乳中分离的83株菌中有85%是致腹泻毒素阳性菌株[37]。在534份生肉样品中有37%、在820份肉制品样品中有42%、在609份调味品和肉类添加剂样品中有31%存在蜡状杆菌，其存在水平为10^2～$10^{[3-5]}$[37]。

除了蜡状杆菌之外，从乳品中分离的蕈状杆菌（*B. mycoides*）在6～21℃下9d之内也可以产生致腹泻肠毒素[37]。据发现，下述菌种不同数量的分离物也是肠毒素产生菌：环状杆菌（*B. circulans*）、迟缓杆菌（*B. lentus*）、苏云金杆菌（*B. thuringiensis*）、短小杆菌（*B. pumilus*）、多黏杆菌（*B. polymyxa*）、胡萝卜杆菌（*B. carotarum*）和巴斯德杆菌（*B. pasteurii*）[37]。

催吐(型)毒素在性质上与致腹泻毒素不同的是，它的相对分子质量为5000[15]，在加热和酸性环境下稳定。它们对胰蛋白酶和胃蛋白酶敏感[47]。催吐毒素产生菌可以在15～50℃温度范围内生长，最适生长温度范围为35～40℃[48]。尽管呕吐综合征最常见的是与食用米饭有关，但是催吐毒素产生菌在米饭上的生长一般并不比其它蜡状杆菌菌株占优势，然而在米饭上有时可以观察到催吐毒素产生菌的细胞数和孢子的出芽数较多[48]。

21.3.2 腹泻综合征

这种综合征相当温和，中毒症状在8～16h内出现，较常见的是在12～13h内出现，症状延续时间约6～12h[49]。中毒的症状包括：恶心（偶尔带有呕吐）、绞痛状腹痛、里急后重、水便。一般不出现发热症状。这种病症与荚膜梭菌食物中毒综合征有些相似[29]。

引发这种病的含毒谷物和谷物制品（包括玉米和玉米粉）、马铃薯泥、蔬菜、肉泥、肝香肠、肉块、乳品、熟肉制品、印度尼西亚米糕、布丁、汤等食品[28]。Gilbert[29]概括了1950～1978年间所报道的这种疾病的发生情况，文中报道了残剩食品中细菌的平板计数记录．所记载的细菌数范围在10^5～9.5×10^8/g，其中多数在10^7～10^8/g范围。最早研

究得比较细致的病例是由 Hauge[39]报道的，所查出的含毒食品是香草酱油，其中的细菌数达到 $2.5\times10^{7}\sim1\times10^{8}$/g。在 1969 年发生于美国的一起中毒事件所涉及的肉块中，发现的细菌数为 7×10^{7}/g[78]。在一次腹泻性中毒事件中所发现血清型的包括 1、6、8、9、10 和 12 几种类型。其中的 1、8、和 12 三种血清型与腹泻综合征及呕吐综合征有关[29]。

21.3.3 呕吐综合征

这种形式的蜡状杆菌食物中毒比腹泻综合征的症状严重。发病的潜伏期为 1～6h，最常见的是 2～5h[80]。它与葡萄球菌食物中毒综合征也类似[29]。这种病症的催吐毒素与葡萄球菌肠毒素不同，它的分子质量低于 10^{4}u，毒素的产生可以与荚膜梭菌肠毒素一样与孢子的形成相关。这种毒素耐热，几乎都是由血清 I 型菌株产生的。它常常与油炸或煮熟的大米食品有关。除了这些食品之外，也报道过巴氏灭菌奶油、面条、马铃薯泥和蔬菜芽苗与发病有关[29]。英国、加拿大、澳大利亚、荷兰、芬兰、日本和美国均报道过发病的事件。美国最早的中毒报道是在 1975 年，引起中毒的食品是马铃薯泥。

引发这种综合征需要的细菌数量似乎比引发腹泻综合征的数量要高，据发现需要高达 2×10^{9}/g 数量[29]。与呕吐综合征有关的蜡状杆菌血清型包括 1、3、4、5、8、12 和 19 型[29]。

参 考 文 献

[1] Alderton, G., K. A. Ito, and J. K. Chen. 1976. Chemical manipulation of the heat resistance of *Clostridium botulinum* spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 492～498.

[2] Alderton, G., and N. Snell. 1969. Bacterial spores: Chemical sensitization to heat. *Science.* 163: 1212～1213.

[3] Anastasio, K. L., J. A. Soucheck, and H. Sugiyama. 1971. Boticinogeny and actions of the bacteriocin. *J. Bacteriol.* 107: 143～149.

[4] Anderson, R. E. 1984. Growth and corresponding elevation of tomato juice pH by *Bacillus coagulans*. *J. Food Sci.* 49: 647～649.

[5] Anellis, A., and D. Berkowitz. 1977. Comparative dose-survival curves of representative *Clostridium botulinum* type F spores with type A and B spores. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 600～601.

[6] Baker, D. A., and C. Genigeorgis. 1990. Predicting the safe storage of fresh fish under modified atmospheres with respect to *Clostridium botulinum* toxigenesis by modeling length of the lag phase of growth. *J. Food Protect.* 53: 131～140.

[7] Barnes, E., and M. Ingram. 1956. The effect of redox potential on the growtl of *Clostridium welchii* strains isolated from horse muscle. *J. Appl. Bacteriol.* 19: 117～128.

[8] Beecher, D. J., J. L. Schoeni, and A. C. L. Wong. 1995. Enterotoxic activity of hemolysin BL from *Bacillus cereus*. *Infect. Immun.* 63: 4423～4428.

[9] Beecher, D. J., J. S. Pulido, N. P. Barney, and A. C. L. Wong. 1995. Extracellular virulence factors in *Bacillus cereus* endophthalmitis: Methods and implication of involvement of hemolysin BL. *Infect. Immun.* 63: 632～639.

[10] Bradshaw, J. G., G. N. Stelma, V. I. Jones, J. T. Peeler, J. G. Wimsatt, J. J. Corwin,

and R. M. Twedt. 1982. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* enterotoxin in buffer and in chicken gravy. *J. Food Sci.* 47: 914～916.

[11] Brent, J., H. Gomez, F. Judson, K. Miller, A. Rossi-Davis, P. Shillam, C. Hatheway, In McCroskey, E. Mintz, K. Kallander, C. McKee, J. Romer, E. Singleton, J. Yager, and J. Sofos. 1995. Botulism from potato salad. *Dairy Food Environ. Sanit.* 15: 420～422.

[12] Bryan, F. L., T. W. McKinely, and B. Mixon. 1971, Use of time temperature evaluations in detecting the responsible vehicle and contributing factors of foodborne disease outbreaks. *J. Milk Food Technol.* 34: 576～582.

[13] Christiansen, L. N., J. Deffner, E. M. Foster, and H. Sugiyama. 1968. Survival and outgrowth of *Clostridium botulinum* type E spores in smoked fish. *Appl. Microbiol.* 16: 133～137.

[14] Ciccarelli, A. S., D. N. Whaley, L. M. McCroskey, D. F. Gimenez, V. R. Doweli, Jr., and C. L. Hatheway. 1977. Cultural and physiological characteristics of *Clostridium botulinum* type G and the susceptibility of certain animals to its toxin. *Appl. Environ. Microbiol.* 34: 843～848.

[15] Graig, J., and K. Pilcher. 1966. *Clostridium botulinum* type F: Isolation from salmon from the Columbia River. *Science* 153: 311～312.

[16] Creti, R., L. Fenicia, and P. Aureli. 1990. Occurrence of *Clostridium botulinum* in the soil of the vicinity of Rome. *Curr. Microbiol.* 20: 317～321.

[17] Crisley, F. D., J. T. Peeler, R. Angelotti, and H E. Hall. 1968. Thermal resistance of spores of five strains of *Clostridium botulinum* type E in ground whitefish chubs. *J. Food Sci.* 33: 111～416.

[18] Dodds, K. L. 1994. *Clostridium botulinum*. In *Foodborne Disease Handbook*, ed Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murrell, and D. O. Cliver. Vol. 1; 97～131. New York: Marcel Dekker.

[19] Dodds, K. L. 1989. Combined effect of watet activity and pH on inhibition of toxin production by *Clostridium botulinum* in cooked, vacuum packed potatoes. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 656～660.

[20] Duncan, C. L. 1973. Time of enterotoxin formation and release during sporulation of *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* 113: 932～936.

[21] Duncan, C. L. 1976. *Clostridium perfringens*. In *Food Microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*, ed. M. P. deFigueiredo and D. F. Splittstoesser, 170～197. Westport, CT: AVI.

[22] Duncan, C. L., and D. H. Strong. 1968. Improved medium for sporulation of *Clostridium perfringens*. *Appl. Microbiol.* 16: 82～89.

[23] Duncan, C. L., and D. H. Strong. 1969. Ileal loop fluid accumulation and production of diarrhea in rabbits by cell-fhee products of *Clostridium perfringens*. *J. Bacteriol.* 100: 86～94.

[24] Eidels, L., R. L. Proia, and D. A. Hart. 1983. Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.* 47: 596～620.

[25] Eklund, M., and F. Poysky. 1965. *Clostridium botulinum* type E from marine sediments. *Science* 149: 306.

[26] Fantasia, L. D., and A. P. Duran. 1969. Incidence of *Clostridium botulinum* Type E in commercially and laboratory dressed white fish chubs. *Food Technol.* 23: 793～794.

[27] Foegeding, P. M., and F. F. Busta. 1980. *Clostridium perfringens* cells and phospholipase C activity at constant and linearly rising temperatures. *J. Food Sci.* 45: 918～924.

[28] Genigeorgis, G., G. Sakaguchi, and H. Riemann. 1973. Assay methods for *Clostridium perfringens*

type A enterotoxin. *Appl. Microbiol.* 26: 111～115.

[29] Gilbert, R. J. 1979. *Bacillus cereus* gastroenteritis. In *Food-borne Infections and Intoxications*, ed. H. Riemann and F. L. Bryan, 495～518. New York: Academic Press.

[30] Gilligan, P. H., L. Brown, and R. E. Berman. 1983. Differentiation of *Clostridium difficile* toxin from *Clostridium botulinum* toxin by the mouse lethality test. *Appl. Environ. Microbiol.* 45: 347～349.

[31] Gimén ez, J. A., M. A. Giménez, and B. R. DasGupta. 1992. Characterization of the neurotoxin isolated from a *Clostridium baratii* strain implicated in infant botulism. *Intect. Immum.* 60: 518～522.

[32] Gimenez, D. F., and A. S. Ciccarelli. 1970. Another type of *Clostridium botulinum*. *Zentral. Bakteriol. Orig. A* 215: 221～224.

[33] Goepfert, J. M., and H. U. Kim. 1975. Behavior of selected foodborne pathogens in raw ground beef. *J. Milk Food Technol.* 38: 499～452.

[34] Goepfert, J. M., W. M. Spira, and H. U. Kim. 1972. *Bacillus cereus*: Food poisoning organism. A review. *J. Milk Food Technol.* 35: 213～227.

[35] Goldner, S. B., M. Solbert, S. Jones, and L. S. Post. 1986. Enterotoxin synthesis by nonsporulating cultures of *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 52: 407～412.

[36] Granum, P. E., W. Telle, ϕ. Olsvik, and A. Stavn. 1984. Enterotoxin formation by *Clostridium perfringens* during sporulation and vegetative growth. *Int. J. Food Microbiol.* 1: 43～49.

[37] Griffiths, M. W. 1990. Toxin production by psychrotrophic *Bacillus* spp. present in milk. *J. Food Protect.* 53: 790～792.

[38] Hall, J. D., L. M. McCroskey, B. J. Pincomb, and C. L. Hatheway. 1985. Isolation of an organism resembling *Clostridium barati* which produces type F botulinal toxin from an infant with botulism. *J. Clin. Microbiol.* 21: 654～655.

[39] Hauge, S. 1955. Food poisoning caused by aerobic spore-forming bacilli. *J. Appl. Bacteriol.* 18: 591～595.

[40] Hauschild, A., H. W., and R. Hilsheimer. 1971. Purification and characteristics of the enterotoxin of *Clostridium perfringens* type A. *Can. J. Microbiol.* 17: 1425～1433.

[41] Hobbs, B., M. Smith, C. Oakley, G. Warrack, and J. Cruickshank. 1953. *Clostridium welchii* food poisoning. *J. Hyg.* 51: 75～101.

[42] Huhtanen, C. N., J. Naghski, C. S. Custer, and R. W. Russell. 1976. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in moldy tomato juice. *Appl. Environ. Microbiol.* 32: 711～715.

[43] Huss, H. H. 1980. Distribution of *Clostridium botulinum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 764～769.

[44] Ikawa, J. Y. 1991. *Clostridium botulinum* growth and toxigenesis in shelf- stable noodles. *J. Food Sci.* 56: 264 -265.

[45] Ikawa, J. Y., and C. Genigeorgis. 1987. Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rockfish fillets stored under modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 4: 167～181.

[46] Imai, H., K. Oshita, H. Hashimoto, and D. Fukushima. 1990. Factors inhibiting the growth and toxin formation of *Clostridium botulinum* types A and B in "tsuyu" (Japanese noodlesoup). *J. Food Protect.* 53: 1025～1032.

[47] Johnson, K. M. 1984. *Bacillus cereus* foodborne illness — An update. *J. Food Protect.* 47: 145～153.

[48] Johnson, K. M., C. L. Nelson, and F. F. Busta. 1983. Influence of temperature on germination and growth of spores of emetic and diarrheal strains of *Bacillus cereus* in a broth medium and in rice. *J. Food Sci.* 48: 286～287.

[49] Kang, C. K., M. Woodburn, A. Pagenkopf, and R. Cheney. 1969. Growth, sporulation, and germination of *Clostridium perfringens* in media of controlled water activity. *Appl. Microbiol.* 118: 798～805.

[50] Kautter, D. A., S. M. Harmon, R. K. Lynt, Jr., and T. Lilly, Jr. 1966. Antagonistic effect on *Clostridium botulinum* type E by organisms resembling it. *Appl. Microbiol.* 14: 616～622.

[51] Kautter, D. A., T. Lilly, Jr., H. M. Solomon, and R. K. Lynt. 1982. *Clostridium botulinum* spores in infant foods: A survey. *J. Food Protect.* 45: 1028～1029.

[52] Konuma, H., K. Shinagawa, M. Tokumaru, Y. Onoue, S. Konno, N. Fujino, T. Shigehisa, H. Kurata, Y. Kuwabara, and C. A. M. Lopes. 1988. Occurrence of *Bacillus cereus* in meat products, raw meat and meat product additives. *J. Food Protect.* 51: 324～326.

[53] Labbe, R, G. 1980. Relationship between sporulation and enterotoxin production in *Clostridium perfringens* type A. *Food Technol.* 34 (4): 88～90.

[54] Labbe, R. G., and C. L. Duncan. 1974. Sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A under conditions of controlled pH and temperature. *Can. J. Microbiol.* 20: 1493～1501.

[55] Labbe, R. G., and C. L. Duncan. 1977. Evidence for stable messenger ribonucleic acid during sporulation and enterotoxin synthesis by *Clostridium perfringens* type A. *J. Bacteriol.* 129: 843～849.

[56] Labbe, R. G., and L. L. Nolan. 1981. Stimulation of *Clostridium perfringens* enterotoxin formation by caffeine and theobromine. *Infect. Immun.* 34: 50～54.

[57] Labbe, R. G., and D. K. Rey. 1979. Raffinose increases sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* type A. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 1196～1200.

[58] Lamanna, C., R. A. Hillowalla, and C. C. Alling. 1967. Buccal exposure to botulinal toxin. *J. Infect. Dis.* 117: 327～331.

[59] Lambert, A. D., J. P. Smith, and K. L. Dodds. 1991. Combined effect of modified atmosphere packaging and low-dose irradiation on toxin production by *Clostridium botulinum* in fresh pork. *J. Food Protect.* 54: 94～101.

[60] Lilly, T., Jr., and D. A. Kautter. 1990. Outgrowth of naturally occurring *Clostridium botulinum* in vacuum-packaged fresh fish. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 73: 211～212.

[61] Lindroth, S., and C. Genigeorgis. 1986. Probability of growth and toxin production by nonproteolytic *Clostridium botulinum* in rock fish stored under modified atmospheres. *Int. J. Food Microbiol.* 3: 167～181.

[62] Lindsay, J. A., A. S. Mach, M. A. Wilkinson L. M. Martin, F. M. Wallace, A. M. Keller, and L. M. Wojciechowski. 1993. *Clostridium perfringens* type A cytotoxic enterotoxins as triggers for death in the sudden infant death syndrome; Development of a toxicoinfection hypothesis. *Curr. Microbiol.* 27: 51～29.

[63] Lund, B. M., A. F. Graham, S. M. George, and D. Brown. 1990. The combined effect of

incubation temperature, pH and sorbic acid on the probability of growth of non-proteolytic type B *Clostridium botulinum*. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 481～492.

[64] Lynt, R. K., D. A. Kautter, and R. B. Read, Jr. 1975. Botulism in commercially canned foods. *J. Milk Food Technol.* 38: 546～550.

[65] Lynt, R. K., H. M. Solomon, and D. A. Kautter. 1984. Heat resistance of *Clostridum botulinum* type G in phosphate buffer. *J. Food Protect.* 47: 463～466.

[66] Lynt, R. K., H. M. Solomon, T Lilly, Jr., and D. A. Kautter. 1977. Thermal death time of *Clostridium botulinum* type E in meat of the blue crab. *J. Food Sci.* 42: 1022～1025, 1037.

[67] Mach, A. S., and J. A. Lindsay. 1994. Activation of *Clostridium perfringens* cytotoxic enterotoxin (s) in vivo and in vitro. Role in triggers for sudden infant death. *Curr. Microbiol.* 28: 261～267.

[68] Mahony, D. E. 1977. Stable L-forms of *Clostridium perfringens*: Growth, toxin production, and pathogenicity. *Infect. Immun.* 15: 19～25.

[69] McClung, L. 1945. Human food poisoning due to growth of *Clostridium perfringens* (*C. welchii*) in freshly cooked chicken; Preliminary note. *J. Bacteriol.* 50: 229～231.

[70] McCroskey, L. M., C. L. Hatheway, L. Fenicia, B. Pasolini, and P. Aureli. 1986. Characterization of an organism that produces type E botulinal toxin but which resembles *Clostridium butyricum* from the feces of an infant with type E botulism. *J. Clin. Microbiol.* 23: 201～202.

[71] McDonel, J. L. 1979. The molecular mode of action of *Clostridium perfringens* enterotoxin. *Amer. J. Clin. Nutri.* 32: 210～218.

[72] McDonel, J. L. 1980. Binding of *Clostridium perfringens*(^{125} I)enterotoxin to rabbit intestinalcells. *Biochemistry* 119: 4801～4807.

[73] Midura, T., M. Gerber, R. Wood, and A. R. Leonard. 1970. Outbreak of food poisoning caused by *Bacillus cereus*. *Pub. Hlth Rept.* 85: 45～47.

[74] Midura, T., C. Taclindo, Jr., G. S. Mygaard, H. L. Bodily, and R. M. Wood. 1968. Use of immunofluorescence and animal tests to detect growth and toxin production by *Clostridium botulinum* type E in food. *Appl. Microbiol.* 16: 102～105.

[75] Midura, T. F., G. S. Nygaard, R. M. Wood, and H. L. Bodily. 1972. *Clostridium botulinum* type F: Isolation from venison jerky. *Appl. Microbiol.* 24: 165～167.

[76] Midura, T. F., S. Snowden, R. M. Wood, fand S. S. Arnon. 1979. Isolation of *Clostridium botulinum* from honey. *J. Clin. Microbiol.* 9: 282～283.

[77] Mishu, B., A. Darweigh, J. T. Weber, C. L. Hatheway, S. El-Sharkaway, and A. Corwin. 1991. A foodborne outbreak of type E botulism in Cairo, Egypt, April. 1991. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 45 (3S): 109.

[78] Moberg, L. J., and H. Sugiyama. 1980. The rat as an animal model for infant botulism. *Infect, Immun.* 29: 819～821.

[79] Moller, V., and I. Scheibel. 1960. Preliminary report on the isolation of an apparently new type of *Cl. botulinum*. *Acta Pathol. Microbiol. Scand.* 48: 80.

[80] Mortimer, P. R., and G. McCann. 1974. Food-poisoning episodes associated with *Bacillus cereus* in fried rice. *Lancet* 1: 1043～1045.

[81] NFPA/CMI Task Force. 1984. Botulism risk from post-processing contamination of commercially canned foods in metal containers. *J. Food Protect.* 47: 801～816.

[82] Odlaug, T. E., and I. J. Pflug. 1979. *Clostridium botulinum* growth and toxin production in tomato

juice containing *Aspergillus gracilis*. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 496～501.

[83] Pace, P. J., E. R. Krumbiegel, R. Angelotti, and H. J. Wisniewski. 1967. Demonstration and isolation of *Clostridium botulinum* types from whitefish chubs collected at fish smoking plants of the Milwaukee area. *Appl. Microbiol.* 15: 877～884.

[84] Pearson, C. B., and H. W. Walker. 1976. Effect of oxidation-reduction potential upon growth and sporulation of *Clostridium perfringens*. *J. Milk Food Technol.* 39: 421～425.

[85] Pederson, H. O. 1955. On type E botulism. *J. Appl. Bacteriol.* 18: 619～629.

[86] Peterson, D., H. Anderson, and R. Detels. 1966. Three outbreaks of foodborne disease with dual etiology. *Pub. Hlth Rept.* 81: 899～904.

[87] Post, L. S., T. L. Amoroso, and M. Solberg. 1985. Inhibition of *Clostridium botulinum* type E in model acidified food systems. *J. Food Sci.* 50: 966～968.

[88] Post, L. S., D. A. Lee, M. Solberg, D. Furgang, J. Specchio, and C. Graham. 1985. Development of botulinal toxin and sensory deterioration during storage of vacuum and modified atmosphere packaged fish fillets. *J. Food Sci.* 50: 990～996.

[89] Rey, C. R., H. W. Walker, and P. L. Rohrbaugh. 1975. The influence of temperature on growth, sporulation, and heat resistance of spores of six strains of *Clostridium perfringens*. *J. Milk Food Technol.* 38: 461～465.

[90] Roy, R. J., F. F. Busta, and D. R. Thompson. 1981. Thermal inactivation of *Clostridium perfringens* after growth at several constant and linearly rising temperatures. *J. Food Sci.* 46: 1586～1591.

[91] Saito, M. 1990. Production of enterotoxin by *Clostridium perfringens* derived from humans, animals, foods, and the natural environment in Japan. *J. Food Protect.* 53: 115～118.

[92] Satija, K. C., and K. G. Narayan. 1980. Passive bacteriocin typing of strains of *Clostridium perfringens* type A causing food poisoning for epidemiologic studies. *J. Infect. Dis.* 142: 899～902.

[93] Skjelkvale, R., and T. Uemura. 1977. Detection of enterotoxin in faeces and anti-enterotoxin in serum after *Clostridium perfringens* food-poisoning. *J. Appl. Bacteriol.* 42: 355～363.

[94] Smelt, J. P. P. M., G. J. M. Raatjes, J. S. Crowther, and C. T. Verrips. 1982. Growth and toxin formation by *Clostridium botulinum* at low pH values. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 75～82.

[95] Smith, A. M., D. A. Evans, and E. M. Buck. 1981. Growth and survival of *Clostridium perfringens* in rare beef prepared in a water bath. *J. Food Protect.* 44: 9～14.

[96] Smith, L. D. S. 1975. Inhibition of *Clostridium botulinum* by strains of *Clostridium perfringens* isolated from soil. *Appl. Microbiol.* 30: 319～323.

[97] Solomon, H. M., E. J. Rhodehamel, and D. A. Kautter. 1994. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in sliced raw potatoes under vacuum with and without sulfite. *J. Food Protect.* 57: 878～881.

[98] Solomon, H. M., and D. A. Kautter. 1988. Outgrowth and toxin production by *Clostridium botulinum* in bottled chopped garlic. *J. Food Protect.* 51: 862～865.

[99] Solomon, H. M., D. A. Kautter, and R. K. Lynt. 1982. Effect of low temperatures on growth of nonproteolytic *Clostridium botulinum* types B and F and proteolytic type G in crabmeat and broth. *J. Food Protect.* 45: 516～518.

[100] Solomon, H. M., R. K. Lynt, Jr., D. A. Kautter, and T. Lilly, Jr. 1971. Antigenic relationships among the proteolytic and nonproteolytic strains of *Clostridium botulinum*. *Appl. Microbiol.* 21: 295～299.

[101] Sonnabend, O., W. Sonnabend, R. Heinzle, T. Sigrist, R. Dirnhofer, and U. Krech. 1981. Isolation of *Clostridium botulinum* type G and identification of type G botulinal toxin in humans: Report of five sudden unexpected deaths. *J. Infect. Dis.* 143: 22～27.

[102] Sperber, W. H. 1983. Influence of watet activity on foodborne bacteria—A review. *J. Food protect.* 46: 142～150.

[103] St. Louis, M. E., S. H. S. Peck, D. Bowering, G. B. Morgan, J. Blatherwick, S. Banerjee. G. D. M. Kettyls, W. A. Black, M. E. Milling, A. H. W. Hauschild, R. V. Tauxe, and P. A. Blake. 1988. Botulism from chopped garlic: Delayed recognition of a major outbreak. *Ann. Intern. Med.* 108: 363～368.

[104] Stark, R. L., and C. L. Duncan. 1971. Biological characteristics of *Clostridium perfringens* type A enterotoxin. *Infect. Immun.* 4: 89～96.

[105] Strong, D. H., and J. C. Canada. 1964. Survival of *Clostridium perfringens* in frozen chicken gravy. *J. Food Sci.* 29: 479～482.

[106] Strong, D. H., J. C. Canada, and B. Griffiths 1963. Incidence of *Clostridium perfringens* in American foods. *Appl. Microbiol.* 11: 42～44.

[107] Strong, D. H., C. L. Duncan, and G. Perna. 1971. *Clostridium perfringens* type A food poisoning. II. Response of the rabbit ileum as an indication of enteropathogenicity of strains of *Clostridium perfringens* in human beings. *Infect. Immum.* 3: 171～178.

[108] Sugii, S., I. Ohishi, and G. Sakaguchi. 1977. Correlation between oral toxicity and in vitro stability of *Clostridium botulinum* types A and B toxins of different molecular sizes. *Infect. Immun.* 16: 910～914.

[109] Sugiyama, H., and D. C. Mills. 1978. Intraintestinal toxin in infant mice challenged intragastrically with *Clostridium botulinum* spores. *Infect. Immun.* 21: 59～63.

[110] Sugiyama, H., and K. H. Yang. 1975. Growth potential of *Clostridium botulinum* in fresh mushrooms packaged in semipermeable plastic film. *Appl. Microbiol.* 30: 964～969.

[111] Thatcher, F. S., J. Robinson, and I. Erdman. 1962. The "vacuum pack" method of packaging foods in relation to the formation of the botulinum and staphylococcal toxins. *J. Appl. Bacteriol.* 25: 120～124.

[112] Tompkin, R. B. 1980. Botulism from meat and poultry products—a historical perspective. *Food Technol.* 34 (5): 229～236, 257.

[113] Trakulchang, S. P., and A. A. Kraft. 1977. Survival of *Clostridium perfringens* in refrigerated and frozen meat and poultry items. *J. Food Sci.* 42: 518～521.

[114] Tsang, N., L. S. Post, and M. Solberg. 1985. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in model acidified systems. *J. Food Sci.* 50: 961～965.

[115] Turnbull, P. C. B. 1986. *Bacillus cereus* toxins. In *Pharmacology of Bacterial Toxins*, ed. F. Dorner and J. Drews, 397～448. New York: Pergamon.

[116] Weiss, K. F., and D. H. Strong. 1967. Some properties of heat-resistant and heat-sensitive strains of *Clostridium perfringens*. I. Heat resistance and toxigenicity. *J. Bacteriol.* 93: 21～26.

[117] Wentz, M., R. Scott, and J. Vennes. 1967. *Clostridium botulinum* type F: Seasonal inhibition by *Bacillus licheniformis*. *Science* 155: 89～90.

[118] Whelan, S. M., M. J. Elmore, N. J. Dodsworth, J. K. Brehm, T. Atkinson, and N. P.

Minton. 1992. Molecular cloning of the *Clostridium botulinum* structural gene encoding the type B neurotoxin and determination of its entire nucleotide sequence. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2345～2354.

[119] Williams-Walls, N. J. 1968. *Clostridium botulinum* type F: Isolation from crabs. *Science* 162: 375～376

[120] Zhou, Y., H. Sugiyama, H. Nakano, and E. A. Johnson. 1995. The genes for the *Clostridium botulinum* type G toxin complex are on a plasmid. *Infect. Immun.* 63: 2087～2091.

[121] Zhou, Y., H. Sugiyama, and E. A. Johnson. 1993. Transfer of neurotoxigenicity from *Clostridium butyricum* to a nontoxigenic *Clostridium botulinum* type E-like strain. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3825～3831.

22. 食物起因的李斯特菌病

以产单核细胞李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）为病原菌的突发性中毒症是一种很特殊的食物中毒病症。获得性免疫缺陷综合征（AIDS）和军团杆菌病是另外两种人类突发的疾病，但是与李斯特菌食物中毒不同的是，这些综合征的病原菌原先未被人们所认识，而且这两种病至今还难以医治。不但产单核细胞李斯特菌易于培养，而且李斯特菌病是文献报道较多的许多动物常患的疾病，人类患这种疾病也并不少见。虽然只有少量的李斯特菌病有记载报道，但是食物中的产单核细胞李斯特菌吸引了世界范围内的关注。关于李斯特菌病的早期信息，请参阅 Seeliger 1961 年的专著[124]、Gray 1963 年的专著[57]和 Gray 与 Killinger 1966 年的综述[58]。文献［29］和［123］是更为近期的综述。

22.1 李斯特菌的分类

李斯特菌是革兰氏阳性、不产孢子和不耐酸的杆形菌，它曾经被称为“*Listerella*”。它的属名在 1940 年改为“*Listeria*”。它们在很多方面类似于索丝菌属（*Brochothrix*）。这两个属的细菌都是触酶阳性，在特性上相互关系密切，它们与乳杆菌属（*Lactobacillus*）的关系也很密切。这 3 个属的细菌都可以利用葡萄糖和其它可发酵糖产生乳酸，但是与李斯特菌和索丝菌不同的是，乳杆菌是触酶阴性的。人们曾经认为，李斯特菌与棒形细菌有关，事实上将它们归类为棒杆菌科（*Corynebacteriaceae*），但是现在已经清楚它们与芽孢杆菌属（*Bacillus*）、乳杆菌属和链球菌属（*Streptococcus*）密切相关。从 16S rRNA 顺序的情况来看，李斯特菌更类似于索丝菌，这两个属与葡萄球菌属（*Staphylococcus*）和库特菌属（*Kurthia*）一起，占据了梭状芽孢杆菌属-乳杆菌属-芽孢杆菌属这一分支系统中芽孢杆菌组和乳杆菌/链球菌组的中间位置，在这一分支系统中，所有成员的细胞中的（G+C）%都低于 50[71]。在李斯特菌、芽孢杆菌和链球菌之间有基因转移作用，在李斯特菌、链球菌、葡萄球菌和乳杆菌之间有免疫交叉反应。索丝菌与李斯特菌具有 338 对相同的嘌呤和嘧啶碱基[95]。虽然丹毒丝菌（*Erysipelothrix*）位于支原体属（*Mycoplasma*）系统线上，但它与李斯特菌和索丝菌至少有 23 对低聚核苷是相同的[95]。某些李斯特菌含有胞壁酸和脂壁酸，芽孢杆菌、葡萄球菌、链球菌和乳杆菌也含有这些酸，但是李斯特菌与这些细菌不同的是，它们的菌落在倾斜光线的照射下会呈现蓝绿色的光泽。

现在已知的李斯特菌属有 6 个菌种，它们的某些特性差别概括在表 22.1 中。在以前的分类中莫氏李斯特菌是与格氏李斯特菌一起出现的[116]。从图 22.1 中可以看出，这两种旧式分类的菌种所处的位置远离其它 5 种菌所处的位置。伊氏李斯特菌被分为两个亚种伊氏李斯特菌伊氏亚种和伊氏李斯特菌伦敦亚种[11]。其中前者可以发酵核糖，但是不能发酵 *N*-乙酰-β-D-甘露糖胺[11]，根据这两点可以将它与后者区分。

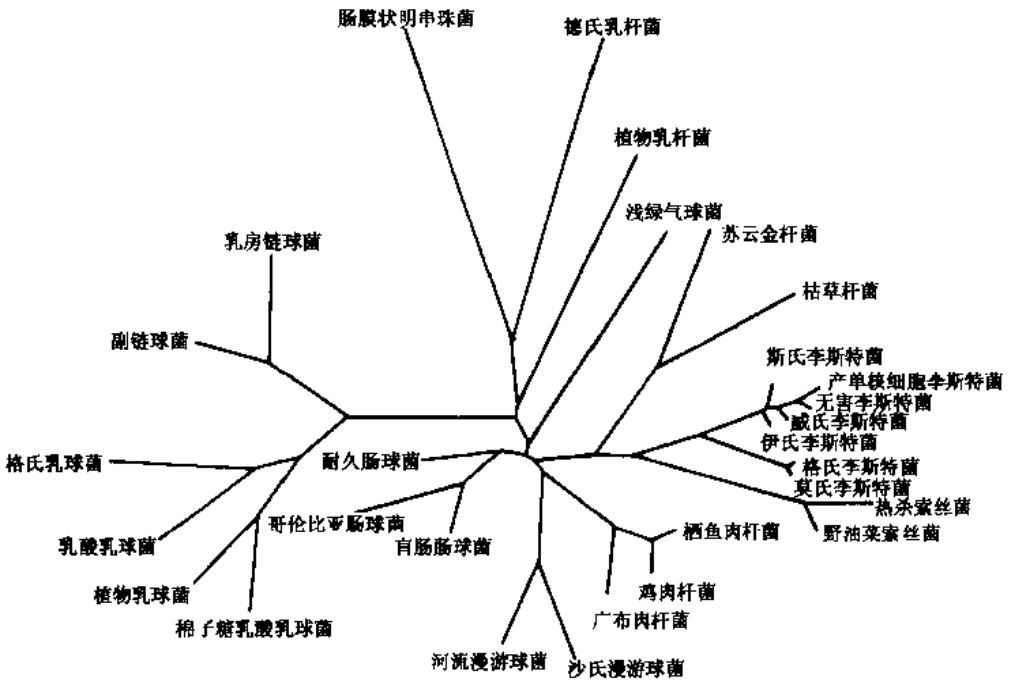


图 22.1　无根分类树或网络

（显示李斯特菌与其它低（G—C）含量革兰氏阳性菌的系统类群关系）

注：(1) 此树根据对 1 340 个核苷连续序列的比较为基础；各序列中的第一和最后一个碱基被用来计算分别相应于大肠杆菌中 107（G）和 1433（A）位的 K_{nuc} 值。

(2)资料来源：M. D. Collins，S. *Wallbanks*，D. J Lane. J Shah，R. Mietupski，J. Smida，M Dorsch，and E. Stackebrandt. Int. J. System. Bacteriol. 41：240246，1991，copyright ©1991 by *American Society for Microbiology*. Used with permission。

表 22.1　　李斯特菌属菌株之间某些特性的差别

菌　种	拉丁名称	木糖	乳糖	半乳糖	鼠李糖	甘露醇
产单核细胞李斯特菌	*L. monocytogenes*		可变	可变	+	—
无害李斯特菌	*L. innocua*	—	-	—	(+)	—
斯氏李斯特菌	*L. Seeligeri*	+			—	—
威氏李斯特菌	*L. welshimeri*	+			可变	—
伊氏李斯特菌	*L. ivanovii*	+	—	可变	—	-
格氏李斯特菌	*L. grayi*	—	+	+	—	+

菌种	马尿酸水解物	CAMP 试验		β-溶血性	G—C/%	血清型
		金黄色葡萄球菌	马红球菌			
产单核细胞李斯特菌	+	+	-	+	37～39	a
无害李斯特菌	+	-		—	36～38	4ab，6a，6b
斯氏李斯特菌		+	-	弱	36	b
威氏李斯特菌		—	—	—	36	6a，6b
伊氏李斯特菌	+	—	+	+	37～38	5
格氏李斯特菌	—	-	—	—	41～42	

注：+为多数菌株阳性；—为阴性。

[a] 1/2a，b，c；3a，b，c；4a，ab，b，c，d，e；"7."。

[b] 与产单核细胞李斯特菌和无害李斯特菌相同但是不包括 5 或 "7."。

在李斯特菌中，聚（核糖醇磷酸酯）型胞壁酸是普遍存在的或只在副型细胞壁上存在的聚合物。格氏李斯特菌中含有的脂壁酸是胞壁酸的一种衍生物，由此可以进一步将它与其它菌种进行区分[118]。另外，脂壁酸经过修饰以后使得菌体对溶解其它菌种的噬菌体变得不敏感[91]。

现在很多人认为CAMP试验是鉴定产单核细胞李斯特菌的决定性试验。不论用金黄色葡萄球菌还是马红球菌，只要CAMP试验阳性的分离物就可以被认为是产单核细胞李斯特菌，但并不一定是产毒的菌株[101]。在金黄色葡萄球菌存在下的促进溶血作用，似乎是由于一种来自产单核细胞李斯特菌的磷脂酰肌醇专一性或磷脂酰胆碱专一性磷脂酶C和一种来自金黄色葡萄球菌的神经鞘髓磷脂酶的作用结果[101]。

丹毒丝菌属（*Erysipelothrix*）的成员常常与李斯特菌有关，这两属细菌的差别概括在表22.2中。与李斯特菌不同的是，丹毒丝菌是不运动、触酶阴性和产H_2S的阳性菌，在它的胞壁质中含有的L-赖氨酸是主要的二氨基酸。与产单核细胞李斯特菌一样，猪红斑丹毒丝菌（*E. rhusiopathiae*）也能导致动物发病——猪丹毒是其病症之一。这种细菌也能感染人类，使人类患丹毒症。

表22.2 李斯特菌属与丹毒丝菌属的比较

属 名	拉丁名称	运动性	触酶	H_2S的生成	主要二氨基酸	(G+C) /%
李斯特菌属	*Listeria*	+	+	-	间 二氨基苯丙氨酸	36～38
丹毒丝菌属	*Erysipelothrix*	-	-	+	L-赖氨酸	36～40

22.1.1 血清类型

李斯特菌的6个菌种都具有抗原特征，从而形成了17种血清型。产单核细胞李斯特菌是主要的病原菌，它具有13种血清型，其中有些血清型是与无害李斯特菌和斯氏李斯特菌共有的。虽然无害李斯特菌只有3种血清型，但它有时被认为是产单核细胞李斯特菌的非病原型变种。无害李斯特菌细胞外表的大量抗原异质可能与多种动物寄主有关，在这些动物中这种菌可以增生繁殖。

这些抗原的最常见分离物是1型和4型。在20世纪60年代之前，据报道含1型抗原的菌种主要在欧洲和非洲存在，而含4型抗原的菌种主要在北美洲出现[58]。但是现在这种模式似乎有所改变。Gray和Killinger 1966年指出，李斯特菌的血清型并不在某些方面与带菌者、患者或地理区域有关，这种观点一般也可以通过对食品的研究得到证实（见下述），但是血清型1/2a和4b确实显示了一定的地理区域差别[125]。在美国和加拿大，血清型4b占了所有菌株的65%～80%。在东欧、西非、德国中部、芬兰和瑞典报道最多的是血清型1/2a，而血清型1/2a和4b在法国和荷兰报道较多，其报道的比例也大致相同[126]。

22.1.2 亚种类型

除了血清类型之外，用于区分产单核细胞李斯特菌菌种和亚种的其它方法也很多，这

些方法概括在第四部分 11 中。这些方法包括噬菌体类型、多位点酶电泳类型(MEE)、限制酶分析(REA)、脉冲电场凝胶电泳(PFGE)、限制片断长度多态型(RFLP)和核糖类型。

22.2 生长

李斯特菌具有许多其它革兰氏阳性细菌典型的营养需求。它们在许多诸如脑心浸出液、大豆胰酶水解液和蛋白胨浸汁等常用的培养基中生长良好。虽然多数营养需求都是针对产单核细胞李斯特菌而报道的，但是其它李斯特菌的营养需求据认为是类似的。它们至少需要 B 族维生素——生物素、核黄素、硫胺素和硫辛酸（α-硫辛酸，某些细菌和原生动物需要的生长因子）和氨基酸——半胱氨酸、谷氨酰胺、异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸[67]。葡萄糖能促进所有李斯特菌种的生长，并产生 L（+）-乳酸。虽然所有的菌种都能经过 EMP 途径利用葡萄糖，但是某些不同的其它单糖和复杂的碳水化合物也能被某些菌株利用。有些李斯特菌与多数肠球菌类似，可以水解七叶树苷，可以在 100g/L 或 400g/L 胆汁，约 10%NaCl、0.025%乙酸铊或 0.04%亚碲酸钾存在的情况下生长。但是与肠球菌不同的是，它们不能在 0.02%叠氮化钠存在的情况下生长，与多数其它革兰氏阳性菌不同的是，李斯特菌可以在 MacConkey 琼脂上生长。虽然铁对于产单核细胞李斯特菌在体内的生长是重要的，但是这种菌明显不具有与铁结合的特定物质，它们通过对铁离子（结合在受体表面上）的还原性代谢来获得对铁的需求。

22.2.1 pH 的影响

虽然李斯特菌可以在 pH6～8 范围内生长，但是它们允许生长和存活的最低 pH 是很多研究课题之一。多数研究是针对产单核细胞李斯特菌进行的，这些研究中的结论是否适用于其它李斯特菌还有待进一步验证。一般情况下，有些菌种可以在 pH4.1～9.6 范围内生长，其生长的温度范围可以从 1～45℃左右（详细数据请见下述）。

一般来说，细菌生长的最低 pH 与培养温度、培养基组成、水分活度（A_w）、NaCl 和其它盐或抑制剂的含量有关。产单核细胞李斯特菌在 pH4.4 的培养基中于 30℃下生长不足 7d[49]，在 pH4.5 的胰蛋白胨中于 19℃下生长[13]，而在 pH4.66 于 30℃下生长了 60d[19]。在第一项研究中，在 pH4.4 于 20℃下生长了 14d，在 pH5.23 于 4℃下生长了 21d[49]。在第二项研究中，在 pH4.5 的生长由于限制 O_2 而有所加快。在第三项研究中，产单核细胞李斯特菌在 pH4.66 和 30℃下的生长在 60d 内都可观察到，在 10℃下的最低生长 pH 是 4.83，而在 5℃下 pH 为 5.13 时也未发现生长。在另一项研究中，产单核细胞李斯特菌的 4 个菌株在 pH4.5 的培养基中于 30℃下培养，培养物在 30d 后生长[111]，但在 pH4.0 或更低 pH 下也未能生长。在 30℃条件下，在橙黄染色血清中培养 5d，pH 3.8～4.0 比 pH4.2～5.0 对菌株的破坏性更大（图 22.2）。

将大豆胰酶水解物用不同的酸调节 pH 时，产单核细胞李斯特菌的 4 个菌株的最低生长 pH 与所用的酸有关。在同样的 pH 条件下，抗微生物的能力为：醋酸＞乳酸＞柠檬酸＞苹果酸＞盐酸[134]。在 pH4.6 和 35℃条件下，菌株会在 1～3d 内生长，有些菌株可以在 pH4.4 条件下生长。不添加 NaCl 的白菜汁，调节到 pH4.1，在 30℃下培养时，这

种菌的 2 个菌株在 8d 内生长，但是当培养基灭菌后用乳酸调节到 pH<4.6，在 30℃培养时，这些菌株出现死亡[21]。在接种量约为 10^3cfu/g、pH5.05 和 5℃条件下，菌株 Scott A 在农家干酪中不能生长[113]。

22.2.2 pH 和 NaCl 的综合影响

pH 与 NaCl 及培养温度的相互作用是某些研究的主题[20,21]。后面的研究者设计了多因素试验方法，来研究这些因素对于一株人体分离菌株（血清型 4b）的生长和存活的综合影响，他们的部分研究结果如图 22.3 所示。在 pH4.66、30℃和不加 NaCl 的情况下，

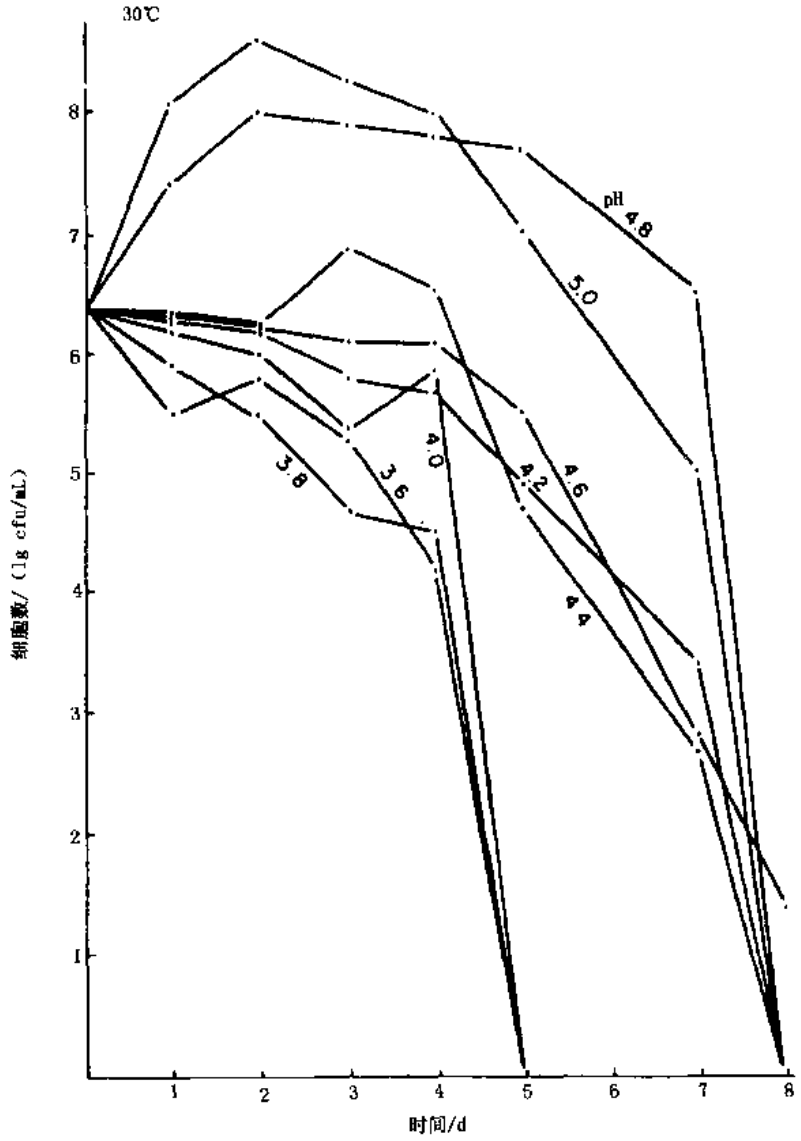


图 22.2 菌株 F5069/（4b）在控制 pH 的橙黄染色血清中的细胞数变化[111]

注：（1）培养温度 30℃，初始细胞浓度为 2.2×10^6cfu/mL。

（2）资料来源：Parish and Higgins[111]，*copyright* ©1989 *by International Association of Milk, Food and Environmental Sanitarians, used with permission.*

可见的生长需要 5d 时间；在同样的 pH 环境中，在 30℃和加 4.0%NaCl 时，出现生长需要 8d，而在 30℃和加 6.0% NaCl 时，出现生长需要 13d[20]。在温度 5℃和不加 NaCl 时，只能在 pH7.0 中生长，出现生长需要 9d；但是在加 4.0% NaCl 时，出现生长需要 15d，加 6.0% NaCl 时，出现生长需要 28d。根据上述研究结果，pH 和 NaCl 的影响只是各自单独的作用，并没有什么协同效应。

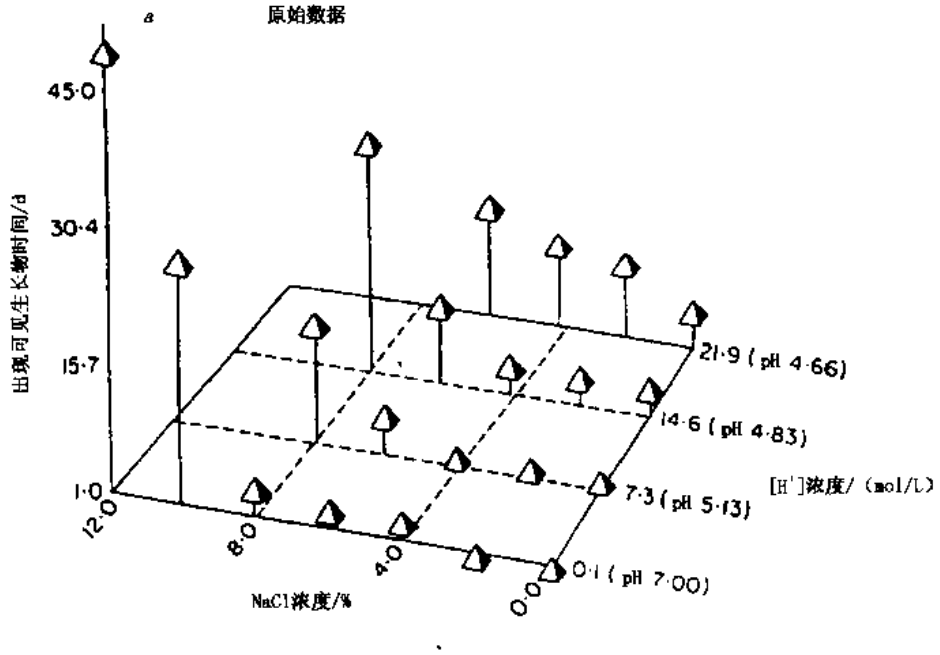


图 22.3　NaCl 和 H⁺浓度对产单核细胞李斯特菌生长的影响[20]

注：(1) 三维散点图：NaCl 浓度/%（x 轴）和 H^+浓度（μmol/L，z 轴）对于达到可见生长物时间（d，y 轴）的影响。

(2)显示：产单核细胞李斯特菌细胞数量（a）在 30℃下至少增长了 100 倍；平均实际值与多项式 1 和 2（未显示）计算的预测值的比较。

(3)资料来源：*Cole et al.*[20]。

22.2.3　温度的影响

据发现，产单核细胞李斯特菌的 78 个菌株在大豆胰酶水解物琼脂上的最低生长温度（1.1±0.3）℃，其最低生长温度范围在 0.5～3.0℃[74]。采用一种平板型连续温度低毒培养箱培养 10d 后，有 2 株菌在 0.5℃下能够生长，有 8 株菌能在 0.8℃或低于 0.8℃下生长。对于其它 22 株菌（无害李斯特菌 19 株，威氏李斯特菌、格氏李斯特菌和莫氏李斯特菌各 1 株），最低生长温度范围为 1.7～3.0℃，平均最低生长温度为（1.7±0.5）℃[74]。产单核细胞李斯特菌的最低生长温度要比其它菌种低约 0.6℃，这表明在这些研究中溶血素可以促进产单核细胞李斯特菌在低温环境下的生长和存活，尽管血清型 1/2a、1/2b 和 4b 在 3.0℃左右的生长比带有 O I 抗原的菌株的生长要弱一些。李斯特菌的最高生长温度约为 45℃。

22.2.4 水分活度（A_w）的影响

在脑心浸出液中用 3 种物质作为湿度调节剂，在 30℃培养的情况下，允许产单核细胞李斯特菌血清型 1、3a 和 4b 生长的最低 A_w 值如下：甘油＝0.90、蔗糖＝0.93 、NaCl＝0.92[35]。在另一项用大豆胰酶水解液的研究中，在 pH6.8 和 30℃培养，用蔗糖作为湿度调节剂时，允许生长的最低 A_w 值为 0.92[112]。回顾这些发现的结果可以看出，产单核细胞李斯特菌是仅次于葡萄球菌，能够在 A_w＜0.93 环境中生长的食物中毒病原菌。

22.3 分布

22.3.1 环境

李斯特菌在自然界的分布广泛，它们可以在腐烂的植物、土壤、动物粪便、污水、青贮饲料和水中被发现。一般来说，可以预测李斯特菌在任何乳酸菌、索丝菌和某些棒形杆菌存在的环境中存在。它们与某些乳制品和青贮饲料的关系，与乳酸产生菌与这些产品的关系一样，是众所周知的。在一项对于海鸥粪便、秃鼻乌鸦粪便和青贮饲料的研究中，饲喂污水物的海鸥比其它地区的海鸥带菌的比例都高，秃鼻乌鸦的粪便中含有的李斯特菌较少[40]。产单核细胞李斯特菌和无害李斯特菌是最常见的菌种，而斯氏李斯特菌只在一份样品中被发现。在同一项研究中，有 44%发霉的青贮饲料和 22.2%大包装青贮饲料中发现含有产单核细胞李斯特菌和无害李斯特菌。在丹麦，在 75 份青贮饲料样品中

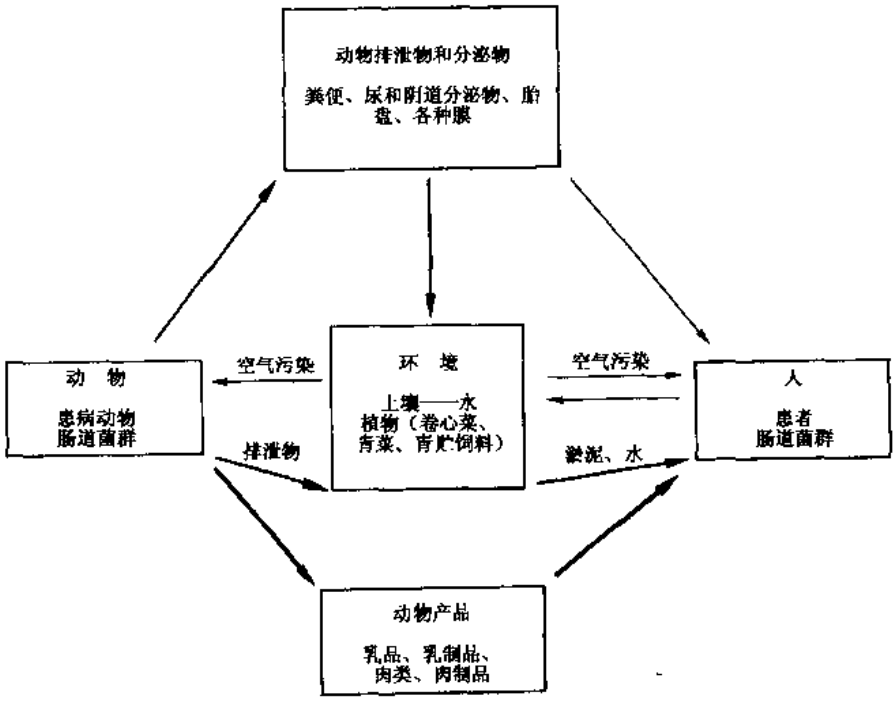


图 22.4 产单核细胞李斯特菌在环境、动物、食品和人体中的传播途径[3]

有 15%含有产单核细胞李斯特菌，而在 75 份牛粪便样品中有 52%含有此菌[136]。这种菌还在 pH 高于和低于 4.5 的青贮饲料中被发现。从来源于稻田、牧场、淤泥、动物粪便、野生动物饲养场和有关地带的样品中，有 8.4%～44%分离出了产单核细胞李斯特菌[141]。据证实，这种菌可以在潮湿的土壤中存活 295d 或更长时间[142]。从美国加利福尼亚州沿岸的海水中、62%的 37 份淡水或低盐水样品中和 17.4%的 46 份沉积物样品中都发现了产单核细胞李斯特菌，但是从 35 份牡蛎样品中未发现这种菌[39]。图 22.4 所示的是产单核细胞李斯特菌在环境中的某些扩散方式和进入人体的途径。

22.3.2 食品与人类

现在已经清楚，任何来源于动物和植物的新鲜食品都可能含有不同数量的产单核细胞李斯特菌。一般来说，这种菌可以在原乳、软干酪、新鲜和冷冻的肉类、家禽和海产品，以及水果和蔬菜产品中存在。由于它们在乳品和乳制品中的大量存在导致了早期的食物中毒，从而引起了人们的注意。在对苏格兰 260 家农场大型乳品容器长达 1 年的调查中，在 160 个出现阳性的容器中，25 个罐只出现了 1 次，但有 7 个出现了 3 次或 3 次以上，一般出现的菌数＜1cfu/mL，但最多的一次出现了 35cfu/mL[41]。在 1988 年对荷兰的 5779 件零售食品的检验中，有 3.0%为这种微生物阳性，其含菌数≥10/g。产单核细胞李斯特菌在冰淇淋中的含量最低，在 649 份样品中只有 0.2%是阳性的，含菌最多的是新鲜肉类，在 416 份样品中有 7.5%呈阳性。另外，在荷兰的 929 份软干酪样品中有 4.6%是阳性的，其中产单核细胞李斯特菌的阳性比例为 3.48%。在英国和威尔士，56 959 份熟食制品中有 4%含有这种菌。在美国长达 39 个月的调查中，来源于全国 1727 份生牛肉样品中有 7.1%呈产单核细胞李斯特菌阳性。在 21 个月的调查中，3700 份雏鸡颈部和背部样品有 19.3%呈阳性[58]。在同一次调查中，来源于美国 4105 家工厂的各种熟食制品有 2.8%呈产单核细胞李斯特菌阳性。

来源于 6 个国家的肉制品中最常见的血清型是 1/2[70]。有 5 个国家的肉制品中的血清型是 4，只有两个国家的产品的血清型是 3。血清型 1/2 比血清型 4 更常见于原乳[93,114]和干酪中[115]，血清型 1 则发现在海产品[140,143]和蔬菜中[84]。血清型 4b 与美国波士顿市的数起人食物中毒有关，其中病原菌来源于马铃薯和萝卜，血清型 1/2a 和 1/2 是最频繁出现的类型[63]。来源于食品的 3 种血清型的出现频率顺序为：1/2a＞1/2b＞4b，而来源于人类李斯特菌病的最常见血清型为 4b、1/2a 和 1/2b[22]。

从人体分离的各种产单核细胞李斯特菌血清型中，来源于英国的 722 株菌有 59%是 4b 型，1/2a、1/2b 和 1/2c 型分别有 18%、14%和 4%[102]。从世界范围患者样品中分离出的菌株中，98%的菌株属于下述血清型：1/2a、1/2b、1/2c、3a、3b、3c、4b 和 5[125]。血清型 4b 是迄今为止在发病事件中发现最多的类型，它导致的中毒症状似乎比其它类型要剧烈得多。

在食品中发现的其它李斯特菌中，无害李斯特菌在肉类、乳品、冷冻海产品、半软干酪、全蛋样品和蔬菜中相当普遍。一般情况下，这种菌是在乳品中发现最多的菌[91]。据报道，8%～16%乳品中含有无害李斯特菌，57 份冷冻海产品中有 46%含有这种菌[140]，42 份液体全蛋样品中有 36%也含有这种菌[85]。在最后一项研究中，无害李斯特菌是发现最

多的李斯特菌，它存在于所有15份阳性样品中。在一次对牛肉和家禽的检验中，有42%的样品含有无害李斯特菌，它的出现频率是产单核细胞李斯特菌的2倍[130]。据发现，无害李斯特菌的出现比例为：在德国生熏软香肠中为83%，德国猪肉中为47%[122]，英国新鲜沙拉中为22%[125]。另一方面，无害李斯特菌在180份分割火鸡中的发生率只有2%[45]。

据发现，威氏李斯特菌存在于原乳（所测样品中有0.3%～3%含此菌）、烤肉、蔬菜和火鸡肉中。在火鸡肉中，有16%样品含有此菌，因此它是这种食品中出现最多的菌种[46]。据发现，在德国有24%生熏软香肠和30%猪肉[122]，在法国冷冻牛肉糜和熟食制品中存在这种菌[128]。已经报道来源于食品的其它李斯特菌只有格氏李斯特菌，在西班牙有89.5%的原乳发现此菌[28]，在牛肉和家禽中也有发现。斯氏李斯特菌被发现存在于原乳、青菜、卷心菜、萝卜、猪肉和香肠中。

22.3.3 发生率

由于分离时需要富集培养，所以每克或每毫升食品中产单核细胞李斯特菌的数量常常无法报道。在美国（尤其是在加利福尼亚和俄亥俄州），据估计大罐储存的原乳中这种菌的数量为1/mL或更少[94]，而来自加拿大的一份报道在原乳中发现的数量约为20×10^3/mL[51]。在自然感染或人工使母牛感染的情况下，所发现的最大细菌数量约为10^4/mL。

虽然产单核细胞李斯特菌在食品中出现的数量很少，以至于直接计数方法没有什么价值，但是样品中有时发现的菌数可以高达$>10^3$/g。某些在食品中含菌数量最高的报道概括在表22.3中。

表22.3 已有报道的产单核细胞李斯特菌在每克或每毫升各种食品中的最高数量

巧克力乳（美国，1994）	～10^4
羊乳软干酪（英国，1989）	＜10^2
引起食物中毒的干酪（瑞士，1983 1987）	10^4～10^6
在温度波动下储存的乳清干酪	3.6×10^6
烟熏贻贝（塔斯马尼亚，1991）	＞10^5
鸡肉卷（美国，1990）	1.9×10^5
馅饼（英国，1990）	10^2～10^6
猪皮（美国，1991）	4.3×10^4
烤牛肉（美国，1991）	3.6×10^1
真空包装咸牛肉（1992）	3.3×10^4
馅饼（澳大利亚，1990），平均数	8.8×10^2
大白菜（美国，1991）	1.4×10^3

22.4 耐热性

虽然1983年在美国马萨诸塞州的一次食物中毒事件中未分离出产单核细胞李斯特

菌细胞，但当时的巴氏灭菌乳被怀疑是含菌的，因此人们对标准的巴氏灭菌方法是否能足以杀死这种菌产生了疑问。自 1985 年以来，大量的文献报道了产单核细胞李斯特菌在乳品中的热致死情况。人们测定了许多产单核细胞李斯特菌菌株在全乳、脱脂乳、奶油、冰淇淋和各种肉类制品中的 D 值。由于这种菌是一种细胞内病原菌，所以有些研究者测定了它们在含菌细胞内和细胞外的耐热性。总的说来，标准的巴氏灭菌方法能够杀死含菌水平在 10^5～10^6/mL 的乳品中的产单核细胞李斯特菌，而不论细胞是游离在细胞外还是在细胞内。某些特殊情况下的研究结果如下。

22.4.1　乳制品

某些产单核细胞李斯特菌菌株的热致死 D 值和 Z 值概括在表 22.4 中。乳品高温短时灭菌方法（71.7℃，15s）的 D 值表明，这种方法足以使这种菌正常存在的活细胞数降低到可检测的水平以下。在大罐中加热或低温长时间加热的灭菌方法（62.8℃，30min）甚至更具有杀伤力（参阅第五部分 16）。对 Scott A 菌株（血清型 4b，分离自美国马萨诸塞州的中毒患者）进行试验时，D 值范围为 0.9～2.0s，Z 值为 6.0～6.5℃。从这些结果看，F5069 菌株（血清型 4b）似乎比 Scott A 菌株更为耐热，尽管 Scott A 菌株被预计是最耐热的 3 个菌株（不包括 F5069 菌株）之一[12]。

表 22.4　　某些产单核细胞李斯特菌热致死试验结果总结

菌株	状态	细胞数/mL	加热介质	加热温度/℃	D 值/s	Z 值/℃	参考文献
Scott A	游离	～10^5	灭菌脱脂乳	71.7	1.7	6.5	10
		～10^5	灭菌脱脂乳	71.7	2.0	6.5	10
		～10^5	灭菌脱脂乳	71.7	0.9	6.3	12
Scott A	细胞内	～10^5	鲜全乳	71.7	1.9	6.0	16
Scott A	游离	～10^5	鲜全乳	71.7	1.6	6.1	16
F5069	细胞内	～10^6	灭菌全乳	71.7	5.0	8.0	15
F5069	游离	～10^6	灭菌全乳	71.7	3.1	7.3	15
Scott A	游离	～10^5	冰奶油混合物	79.4	2.6	7.0	10
		～10^8	pH7.2 磷酸盐缓冲液	70.0	9.0	-	9
		～10^8	pH5.9 肉汁	70.0	13.8	--	9
		～10^7	液体全蛋	72.0	36.0	7.1	42
10 支菌株		～10^7	辐照肉泥	62.0	61.0	4.92	37
鸡肉	肉类分离物	～10^6	牛肉	70.0	—	7.2	98
		～10^5	鸡肉泥	70.0	—	6.7	98

注：～为大约。

产单核细胞李斯特菌的耐热性不受它在细胞内位置的影响。当 Scott A 菌株在全乳中以 2.6×10^5cfu/mL 的浓度游离存在时，在 71.7℃加热 15s 后，同样的 5 次试验都未发现有细胞存活[42]。在用牛噬菌细胞接种 Scott A 菌株的 7 次体外加热试验中，在平均接种量为 5×10^4cfu/mL 水平时，也未见有细胞存活。这些研究者还用 Scott A 菌株感染的牛进行试验，当 Scott A 菌株的细胞数在 1.4×10^3～9.5×10^3cfu/mL 范围内，经过 11 次加

热（在 71.7℃加热 15s）试验，仍然未发现有细胞存活[92]。采用 5 株产单核细胞李斯特菌在全乳、脱脂乳和 11%非脂乳固体的体系中进行热致死试验时，Donnelly 和 Briggs[30]发现体系的组成并不影响热致死效果，在 62.7℃下，D 值为 60s 或 60s 以下。这其中所用的 5 个菌株包括血清型 1、3 和 4。当自然感染血清型 1 菌株（感染细胞浓度约为 10^4/mL）的牛乳在 60～78℃温度范围进行高温短时灭菌时，经过 69℃或 69℃以上的温度处理后，未检出有细胞存在[38]。在对产单核细胞李斯特菌在牛乳中的耐热性早期研究的回顾中，Mackey 和 Bratchell[99]的结论是正常的巴氏灭菌方法能够将这些细菌杀死，但是在大容器中的低温长时灭菌方案要比高温短时的方案安全范围更宽。它们的数学模型预测的 D 值对于低温长时灭菌为 $39D$，而对于高温短时为 $5.2D$。

22.4.2 非乳制品

对于液体全蛋和肉制品，其 D 值一般要高于乳制品，这是一个不难预测的事实，因为蛋白质和脂类对于微生物的耐热性有增强作用（已在第五部分 16 中讨论过）。对于从鸡肉制品中分离出来的产单核细胞李斯特菌菌株，在 70℃时的 D 值为 6.6～8.4s，这个 D 值对于牛肉和两份禽肉基本是一致的[98]。在一项研究中，在 9 份经过 70℃加热处理的牛肉泥中有 8 份样品经过富集培养可以分离出活性细胞[4]。在一次对于蓝蟹肉的研究中，Scott A 菌株细胞浓度在 10^7 时的 D 值为 2.61min，而 Z 值为 8.4℃，这表明这种蟹肉采用 85℃，加热 30min 的灭菌方法，已足以杀死这种微生物而获得安全的产品[62]。将法兰克福香肠加热到内部温度达 71.1℃时，所显示的效果足以使 Scott A 菌株的细胞数下降 3 个对数单位[115]。当肉制品加热到内部温度达到 70℃并维持 2min 后，就能杀死产单核细胞李斯特菌[15,58,104]。

液体全蛋于 60℃加热 3.5min，计算出对 Scott A 菌株的 D 值为 2.1min[5]。但同样的菌株在液体全蛋加 10%NaCl 于 63℃加热 3.5min，计算出的 D 值为 13.7min，而在同样条件下液体全蛋加 10%蔗糖所得出的 D 值为 1.9min。加入 10%NaCl 后，使得 A_w 值从 0.98 下降到了 0.915，这可能是它可以使 D 值升高的部分原因。据发现，有 7 种血清型在 4℃培养 5d，然后再在 37℃培养 7d 后，它们的 D 值有所升高[133]。在盐水中，D_{60}=0.72～3.1min，而 D_{62}=0.30～1.3min。

在香肠型肉制品中，Farber[37]测定的 D 值在 62℃时为 61s，但是添加腌制配料以后，其 D 值升至 7.1min，这表明腌制配料有一定的热保护作用，这些腌制配料包括亚硝酸盐、葡萄糖、乳糖、玉米糖浆和 30g/L NaCl。在牛肉泥中加入 30%脂肪、3.5%NaCl、200mg/kg亚硝酸盐和 300mg/kg 硝酸盐后，Mackey 等人[98]发现产品中菌株数约增加了 1 倍，他们认为这是由于加入了 3.5% NaCl 而增强了细菌耐热性的结果。Lund 等人[96]研究了微波加热对 Scott A 菌株的致死情况，试验时将 10^7 细胞/g 接种到鸡肉中，而将 10^5～10^7 细胞/g 接种到鸡皮上。在家用型微波炉中加热，使得内部温度足以达到 70℃并维持 1min，结果显示细菌的细胞数降低了 6 个对数单位。产单核细胞李斯特菌的热致死性质与加热介质的 pH 的关系与其它多数细菌一样，当介质的 pH 接近于 7.0 时，细胞的耐热性比在酸性范围的耐热性强。这一关系用大白菜汁做试验也得到了证实，在白菜汁为 pH5.6 时的 D 值要高于 pH4.6 时的 D 值[6]。

22.4.3 亚致死加热对于耐热性的影响

先用亚致死剂量对产单核细胞李斯特菌细胞进行加热，这样对细胞后来的耐热性是否有增强作用现在还不清楚。有些研究者报道这并没有增强效果[12,14]，而另一些研究者报道这样做增强了菌体的耐热性[36,39,89]。在一项研究中，Scott A 菌株在 48℃经过 20min 的“热休克”处理后，在后来 55℃的加热过程中，D 值增加到原来的 2.3 倍[89]。在另一项研究中，在肉汤和超高温处理后的牛乳中培养的 Scott A 菌株经过 48℃、60min 处理后，在后来 60℃下其耐热力有所增强[39]。在后来的一项研究中，将香肠混合液中细胞浓度为 10^7/g 的 10 支菌株经过 48℃、30min 或 60min 热处理后，在后续的 62℃或 64℃加热过程中未观察到耐热性有明显增强，但是经过 120min 处理后的菌株在 64℃下的 D 值确实平均增加了 1.4 倍[36]。在这一项研究中，当细胞储存在 4℃下，其耐热性至少维持了 24h。如果用亚致死剂量加热确实能增强菌体的耐热性，即使 D 值有 2～3 倍的增加，对于含菌数少于 10/mL 的乳品来说也不会带来问题。

22.5 毒素性质

在李斯特菌属的菌种中，产单核细胞李斯特菌是人们关注的食物中毒病原菌。虽然伊氏李斯特菌也能在试验老鼠中繁殖，但是它的繁殖比产单核细胞李斯特菌要弱得多，在老鼠体内的细胞数达到 10^6 时也不会导致老鼠患病[67]。无害李斯特菌、威氏李斯特菌和斯氏李斯特菌是非病原菌。与产单核细胞李斯特菌有关的最值得关注的毒素是李斯特菌溶血素 O。

22.5.1 李斯特菌溶血素 O 和伊凡洛菌溶血素 O

一般来说，能致病和产生毒素的产单核细胞李斯特菌可以在血液琼脂上产生 β-溶血素，并能利用鼠李糖产酸，但不能利用木糖产酸。用体外毒素纯化或直接培养的方法可以增强溶血能力的菌株是致病菌株[117]。在溶血性能方面有充分证据表明，所有此菌种的产毒菌株都能产生一种负责红血球 β-溶血的物质，并能破坏吞噬了此菌的噬菌细胞。这种物质被称为“李斯特菌溶血素 O”(LLO)，它与链球菌溶血素 O (SLO) 和肺炎球菌溶血素 O (PLO) 是高度同源性的物质。纯化的 LLO 相对分子质量为 60 000，由 504 个氨基酸组成[48,104]。它主要是在指数生长期内产生的，在生长后 8～10h 内达到最高水平[47]。用葡萄糖作为碳源时，在 26℃下合成的 LLO 比在 37℃下合成的少，在 0.2%葡萄糖中于 37℃合成的量最多[26]。在 35℃好氧或厌氧条件下，山梨酸盐水平在 2%时可以抑制 LLO 的合成[82]。在所有产单核细胞李斯特菌菌株中都可以检出 LLO，包括那些非溶血性的菌株，但是在威氏李斯特菌或格氏李斯特菌中检测不出这种毒素。编码这种毒素的基因是线粒体基因，被称为“*hly*”。它的毒性作用将在下面讨论。

伊氏李斯特菌和斯氏李斯特菌能产生依赖于硫醇的外毒素，它与 LLO 类似，但不等同于 LLO。这种外毒素在伊氏李斯特菌中生成量较大，而在斯氏李斯特菌中只有少量生成[47]。伊氏李斯特菌产生的硫醇激活的环状毒素被称为“伊凡洛菌溶血素 O”(ivanolysin

O，ILO)。伊氏李斯特菌培养的抗血清能与产单核细胞李斯特菌培养的抗血清及 SLO 发生交叉反应[82]。采用转位子-诱导的突变株，ILO-缺陷型突变株在鼠和鸡胚胎中不能产生毒素[71]。

纯化的 LLO 与 SLO 和 PLO 显示出下述共同性质：被巯基化合物（如半胱氨酸）激活，被低水平的胆固醇抑制，和在免疫交叉反应中显示相同的抗原特性。与 SLO 不同的是，LLO 在 pH5.5 下呈现活性，但是在 pH7.0 下不呈现活性，这表明它有在巨噬细胞吞噬体（吞噬溶酶体）中呈现活力的可能性。致死老鼠的 LD_{50}值约为 0.8μg，在皮下注射之后有一种诱导相应反应[48]。

产单核细胞李斯特菌这种细胞外毒素的致病作用在许多年以前就已经有过报道。早在 20 世纪 60 年代，已证明一种溶解细胞的因子与绵羊腹膜分泌细胞和产单核细胞李斯特菌在体外的相互反应有关，这种情况表明，上述因子可能是由位于噬菌细胞内的细菌产生的[109,110]。有数组研究者对这种溶血素进行了研究，包括 Girard 等人[52]和 Njoku-Obi 等人[110]。这种溶血素可以使 β-葡萄糖苷酸苷酶和酸性磷酸酯酶从老鼠和兔的溶菌体中释放出来，还原剂可以增强它的活性，而胆固醇可以消除它的活性，这一点已经在 20 世纪 60 年代得到了证明[69,80]。虽然这种溶血素长期以来被认为在产单核细胞李斯特菌中毒症中起关键作用，但是研究这种作用的最终结果是导致了分子生物学和遗传技术领域的一系列发现。

1986 年，一种 26-kb 共扼转位子（Tn1545）以 $1/10^8$ 的频率被转移到了产单核细胞李斯特菌溶血性菌株中，结果使菌株失去了产生溶血素和致病能力[43]。非溶血性突变菌株在试验老鼠体内不能生长，并且在脾脏和肝脏中很快消失。在有关的研究中，李斯特菌溶血素 O 的基因在转位子 Tn916 插入产单核细胞李斯特菌 DNA 以后失去了活性[77]，转位子 Tn917 也有这种作用[23]。在数株丧失毒性的突变菌株中，这些转位子插入点在李斯特菌溶血素的基因之内。当李斯特菌溶血素基因被从一株弱溶血性菌株（血清型1/2a）中克隆到了大肠杆菌 K12 菌株中时，它在 DNA 上的位点和它的功能才得到了最终验证[87]。

22.5.2 入侵细胞后的作用

产单核细胞李斯特菌通过口服途径进入动物体内之后，会在肠道内很快繁殖，但对它们的繁殖机制目前还了解得很少。从肠道中出来之后，这种菌能入侵各部分组织（包括孕妇的胎盘），进入血循环系统，再通过血流到达其它敏感的体细胞中。作为一种细胞内的病原体，这种菌必须首先到达敏感细胞中，然后才能在这些细胞中繁殖。这种菌对噬菌细胞的入侵分为两步：直接进入吞噬体和从吞噬体进入噬菌细胞的细胞质中。

进入非噬菌细胞是很困难的。入侵非噬菌细胞需要两种表面结合蛋白，它们分别被称为 In1A 和 In1B[88]。前者的分子质量为 8.8×10^4u，而后者的分子质量为 6.5×10^4u。它们的作用是帮助产单核细胞李斯特菌进入寄主细胞，但是究竟是怎样起作用的，仍然是一个未知因素。In1A 蛋白被称为内质素，已知它是侵入培养中的上皮细胞所需要的物质，而 In1B 是侵入培养中的鼠肝细胞所需要的物质[33]。另一种与李斯特菌入侵有关的蛋白质是 p60，它是分子质量为 6×10^4u，是由 *iap* 基因编码的蛋白质，所有李斯特菌均可

分泌。

进入细胞之后，李斯特菌可以利用溶血素 O 的溶解细胞作用逃逸出吞噬体而进入细胞质中，在细胞质中它们被肌动蛋白丝状体包围。这些肌动蛋白是由一种表面蛋白质所组成的，这种表面蛋白质的分子质量为 9×10^4u，是由 *act*A 基因编码的。这些肌动蛋白丝状体形成了一个聚合肌动蛋白尾巴，推动细菌细胞从一个组织到另一个组织。虽然伊氏李斯特菌并不具有 9×10^4u 的表面蛋白质，但是它能利用所具有的 Caco-2 尾线从一个细胞转移到另一个细胞[76]。对于产单核细胞李斯特菌，细胞间的转移是由两种磷脂酶的一种或两种协助进行的，这些酶能够分解哺乳动物细胞磷脂的极性头部基团，释放出二酰基甘油和水溶性磷酸酯[132]。

22.5.3 产单核细胞活性

我们对于产单核细胞李斯特菌细胞上至今仍未完全了解的一个有意义部分是细胞外层的一种含脂组分，这种组分至少与革兰氏阴性菌典型的脂多糖在一种性质上相同。在革兰氏阴性菌中，脂多糖位于外层细胞膜上，但是李斯特菌和其它革兰氏阳性菌并不具有外层细胞膜。几十年前有人发现了产单核细胞李斯特菌细胞的苯酚-水浸出物可以诱导单核细胞的生成，正是因为这种产生单核细胞因子的存在，这种菌才获得了“产单核细胞”这个种名。这种类似于脂多糖的部分占了细胞干重的 6%，并且与细胞膜有关[144]。它的相对分子质量约为 1000，不含有氨基酸和碳水化合物，只促进单核细胞的生成[41]。它对组织的毒性很低，没有血清学活性[135]，但是它能在体外杀死巨噬细胞[44]。它似乎与脂多糖具有下述同样的性质：导致兔发烧和致死、发生原位施瓦茨曼反应、含有酰化的羟基脂肪酸、与鲨鱼变形细胞溶解剂呈阳性反应、含有 2-酮基-3-脱氧辛酮酸、含有庚糖[144]。在导致鲨鱼变形细胞溶解的活性方面，需要 1μg/mL 的浓度来达到阳性反应[127]，而用脂多糖时，只要几皮克的量就能达到同样的作用。

产单核细胞活性导致了免疫球蛋白 M 抗体的产生，而由热致死血清型 4b 菌株产生的这种抗体似乎是导致兔瞬时冷凝集综合征的病因[144]。采用制备血清型 1 菌株氯仿-甲醇或盐水浸出液的方法，另一组研究者提取了产单核细胞活性因子和一种免疫抑制活性组分[46]，只要 10μg 产单核细胞活性因子就可导致老鼠中循环性单核细胞增加 9 倍。另一方面，Hether 和 Jackson[64]未能证实他们从血清型 1 菌株中获得的苯酚-水浸出物与脂多糖的类似性，这些研究者的看法是，脂壁酸是特殊革兰氏阳性两亲物中的浸出物质。有一组研究者在产单核细胞李斯特菌细胞中发现的脂壁酸水平为 8.5～11.5mg/g[138]，它在鲨鱼变形细胞溶解试验中呈现阳性反应。因此，产单核细胞活性因子在产单核细胞李斯特菌的总体毒性中所起的详细作用仍然不十分明确，但是它在某些方面已经显示了促进骨髓细胞有丝分裂的作用，并且也能作为免疫抑制因子参与反应。作为一种细胞内病原菌，应该导致单核细胞的生成，但这种单核细胞最终又能影响到它的分解，这一点看起来似乎是矛盾的，但是由于产单核细胞活性因子在体外能够杀死巨噬细胞，它在体内也应该具有同样的作用。

22.5.4 神经鞘髓磷脂酶

伊氏李斯特菌是已知的绵羊病原菌，它能导致绵羊流产，产生大量的绵羊红血球溶

血素。这种菌中具有李斯特菌溶血素似的溶红血球素、神经鞘髓磷脂酶和卵磷脂酶[82]。神经鞘髓磷脂酶的相对分子质量为 27 000-39[J]。虽然上述溶红血球素是溶解绵羊整个体内红血球的毒素，但是马红球菌（*Rhodococcus equi*）能够促进不完全溶血圈的增大，这种促溶血作用似乎是上面提到的两种酶导致的。在一项研究中，缺乏神经鞘髓磷脂酶和另一种蛋白质的突变株显示了其毒性比野生型菌株的弱[11]。

22.6 试验动物与感染剂量

最早用于试验产单核细胞李斯特菌毒性作用的实验动物是一只兔和一头几内亚猪，实验中将细菌细胞悬浮液注射到动物的眼睑内（称为安通氏试验），当注射细胞数达到 10^5 时，导致动物患了结膜炎[2]。很多研究者研究了鸡胚胎被感染的情况。接种 100 个产单核细胞李斯特菌细胞至 10d 龄鸡胚胎尿囊中后，导致了胚胎在 2～5d 内死亡。对于产毒菌株来说，LD_{50} 值在 6×10^2 个细胞以下。在这种试验方法中，伊氏李斯特菌也有致死作用。以每个胚胎 100～30 000 个细胞的剂量将这种菌注射到 10d 龄鸡胚胎绒毛膜尿囊膜中后，在 72h 内导致了胚胎的死亡，而注射到老鼠中后，在 5d 内导致了死亡[3,147]。虽然安通氏试验和鸡胚胎可以用来测定李斯特菌菌株的相对毒性，但是选择老鼠的试验可以获得关于细胞免疫能力的附加信息。

老鼠不但是用于李斯特菌毒性研究使用最多的试验动物，它们还广泛用于 T 细胞的一般免疫性的研究。用于试验的老鼠一般是生长正常的、哺乳期、幼龄和成年老鼠，有时也采用特殊培养的老鼠，例如无胸腺（T-细胞缺陷）的不长毛老鼠。李斯特菌细胞可通过腹膜注射、静脉注射和口服输入到被试动物体内。当采用正常的成年鼠进行试验时，所有的产单核细胞李斯特菌光滑型和溶血性菌株都是以 10^3～10^4/只的水平注射到鼠的肾脏内[67]。对于许多菌株来说，注射剂量为 10^5～10^6 时可以致死正常的成年鼠，但是发现有时也需要 7×10^9 的剂量才能获得一个半数致死率（LD_{50}）。也有报道称对于 15g 的老鼠只需要 50 个细胞的剂量（见下述）。

虽然对于老鼠最常采用腹膜注射的方法，但是口服方法常用于试验李斯特菌在胃肠道中的行为。通过口服途径进入 15g 重的老鼠体内之后，导致了更迅速的感染，在 6d 的试验过程中，口服者在 3d 的死亡数比腹膜注射导致的死亡者多[111]。对于 15 份从食物和临床患者分离的样品中的产单核细胞李斯特菌来说，采用这种方法试验的半数致死剂量范围大约为（50～4.4）$\times10^5$ 个细胞[114]。有一组研究者将血清型 4b 菌株用腹膜注射和口服饲喂的方法输入 6～8 周龄的老鼠体内，以研究它们在正常和特殊状态下的作用。菌株细胞悬浮在含 11%非脂乳固体的培养液中输入到下述 4 组老鼠体内：正常的、饲喂氢化可的松的、怀孕和饲喂甲氰咪胍的。能够导致 50%感染的最低剂量对于正常组为3.24～4.55 对数单位，对于饲喂了可的松的一组为 1.91～2.74 对数单位，对于怀孕组为 2.48 对数单位[55]。饲喂甲氰咪胍的一组老鼠，半数感染剂量与正常组接近。这些研究者发现，在半数感染剂量这个指标上，腹膜注射与口服饲喂两种方式没有明显差别。对于新生的老鼠（出生后 24h 之内），腹膜注射产单核细胞李斯特菌的半数致死剂量为 63/cfu，但是对于 6～8 周龄的老鼠来说，用同样的方式注射时，其半数致死剂量达到 3.2×10^6/cfu[18]。

当新生鼠注射 γ-干扰素之后，对产单核细胞李斯特菌的致死作用有了一定的抗性（见下述）。当 15～20g 的瑞士老鼠饲喂角叉菜胶以后，其半数致死剂量约为 6～3100cfu[27]。

用产单核细胞李斯特菌产毒菌株感染不长毛老鼠之后，其中毒反应是慢性的，而对于幼龄鼠和巨噬细胞缺陷的成年鼠，产毒菌株能导致死亡。在成年的试验鼠体内，产单核细胞李斯特菌粗糙型菌株只能很缓慢地增殖，并能导致一种弱免疫性，但是这种类型的菌株可以杀死幼龄鼠，而不长毛的鼠会存活下来[67]。在产毒菌株的非致命性感染中，细菌细胞在脾脏内繁殖，这样会形成一种对再次感染的抗性，而不论以后感染的菌株是何种血清型[67]。

总的来说，试验老鼠的研究证实，免疫系统受到损伤的动物比正常动物对产单核细胞李斯特菌更为敏感，这与人体的情况是一致的。从正常成年鼠的最低感染剂量来推断人体的感染剂量是比较困难的。有人认为产单核细胞李斯特菌的水平在 10^2/cfu 以下是不会导致健康寄主患病的[55]。Gilbert 和 Pini[51]报道，在产单核细胞李斯特菌含量为 10^4～10^5/g 的 9 份干酪样品中，未见有导致人体患病的情况。

22.7 李斯特菌病综合征的发生率和特征

22.7.1 发生率

虽然 Hulphers[74]在 1911 年最早对产单核细胞李斯特菌进行了描述，但是对于它的详细描述是在 1923 年由 Murray 等人进行的[104]。从那时以后，它被证实是 50 多种动物的病原菌，除了家禽、鱼类和甲壳类动物之外，还包括人类。第一例被报道的人体患李斯特菌病是在 1929 年，这种病后来在世界范围内不断有零星的报道。在导致患李斯特菌病的菌株中，产单核细胞李斯特菌占人体病原菌的 98%，占动物病原菌的 85%[102]。至少有 3 种人体患病是由伊氏李斯特菌引起的，而有一例是斯氏李斯特菌引起的。1981 年英国约有 60 例人体患病的报道，而在 1985 年约有 140 例，关于动物患病的病例也有类似的增长倾向[102]。在 1986—1988 年间，英国和威尔士的李斯特菌病发病数增长了 150%，在此期间人类的沙门氏菌病也增长了 100%[24]。在英国的 558 位患者中，总的致死率为 46%，而对于儿童和成人患者的致死率分别为 51%和 44%[102]。在 1983—1987 年间，英国有 775 人发病的报道，其中死亡人数（不包括流产致死者）为 219 人，致死率达 28%，包括 44 例流产致死者在内的致死率达到了 34%[60]。在 1974 年以前，法国每年纪录的病例有 15 起，但是在 1975 年和 1976 年分别为 115 和 54 起[17]。除了 3 支菌株之外，所有 145 株菌的血清型都是 4 型。法国 1987 年的发病人数为 687 人[22]。在 1984 年之前的 9 年时间内，瑞士洛桑李斯特菌病的发病人数每年平均为 3 人，但是在 1983—1984 年间的 15 个月内就有 25 人发病[106]。在所检出的 40 株菌中有 38 株是血清型 4b，其中 92%具有同样的噬菌体类型。

总的来说，除了少数例外情况之外，食物中毒导致的李斯特菌病发病事件在过去的几年中逐渐减少，从表 22.5 中可以看出这种倾向。在 20 世纪 90 年代初期和中期，据估计在下述几个国家中每百万人中的患病人数如下：

澳大利亚（1992）	2
加拿大	2～4
丹麦	4～5
英国	2～3
美国	～4

美国 1993 年的发病人数估计为 1092 人，其中 248 人死亡。并不是所有的发病都是食物中毒引起的，因为也有其它原因导致患病的报道。

表 22.5　某些证实和未证实的李斯特菌食物中毒事件

年份	来源	发病人数/死亡数	地域
1953	原乳	2/1	西德
1959	鲜肉/家禽[a]	4/2	瑞典
1960～1961	各种/未知	81/?	西德
1966	乳/乳制品	279/109	西德
1979	威吉思/乳?[b]	23/3	波士顿
1980	贝类	22/6	新西兰
1981	油菜沙拉	41/18	加拿大
1983	巴氏灭菌乳[b]	49/14	波士顿
1983～1987	瑞士干酪	122/34	瑞士
1985	墨西哥式干酪	142/48	加利福尼亚
1986～1987	蔬菜?[b]	36/16	费城
1987～1989	派特沙拉	366/63	英国
1987	软干酪	1	英国
1988	山羊乳干酪	1	英国
1988	熟雏鸡肉	1	英国
1988	熟雏鸡肉	2	英国
1988	火鸡块	1	俄克拉何马
1989	猪肉香肠	1	意大利
1988	百褶片	1	加拿大
1989	腌制蘑菇	1	芬兰
1989	河虾	9/1	美国
1989	猪肉香肠	1	意大利
1990	原乳	1	佛蒙特
1990	猪肉香肠	1	意大利
1990	派特沙拉	11/6	澳大利亚
1991	烟熏贻贝	3/0	澳大利亚
1992	烟熏贻贝	4/2	新西兰
1992	山羊肉（来自加利福尼亚）	1	加拿大
1992	猪舌（在凝胶冻中）	279/85	法国
1993	猪肉重味罐头	39/0	法国
1994	巧克力乳	52/0	美国
1994	腌制橄榄	1	意大利
1995	布里干酪	17/0	法国

[a] 未定。

[b] 与流行病有关，未鉴定出病原微生物。

22.7.2 病原菌的来源

由于食物中毒导致人体患李斯特菌病的发生率很低，而且发病事件发生得比较零散，所以产单核细胞李斯特菌病原菌菌株的来源就特别值得注意。虽然乳制品的发病被认为是病原菌落入原乳中的缘故，但是这种推测并不是总能得到证实。在一项研究中，1985年从美国加利福尼亚州（供应给被指控干酪厂的）27家农场的1123份原乳样品中，Donnelly等人未能分离出导致患病的血清型4b菌株[31]。但是他们从作为对照的一家农场的一个系列16份样品中分离出了血清型1菌株。在回顾1986年大部分时间人类患病事件后，Hird[55]认为，虽然不能在所有情况下根据所得证据得出结论，但是现有的证据表明李斯特菌病在一定程度上是可传染的人畜共患病（在正常条件下可以由脊椎动物传染给人类）。Hird认为健康的动物带菌者与患李斯特菌病的动物是这种微生物的重要来源，但是具体哪一种来源对食物中毒的影响程度更大，还难以定论。

在来源于患乳腺炎牛的左前部乳房的乳中人们发现了产单核细胞李斯特菌，但是来源于其它部位乳房的乳中未发现此菌[35]。在荷兰被检测的健康牛中，产单核细胞李斯特菌带菌阳性比例约为10%，而来源于丹麦屠宰场的工作人员粪便中只约有5%含有此菌[75]。在食品加工厂工作的人员当中，不论他们的工作岗位是什么，其健康人体的带菌比例都是相近的[75]。在英国长达18个月的调查中，5000份粪便样品中只有32份(0.6%)呈阳性[84]。据发现，在医院中天生带菌的新生婴儿会将产单核细胞李斯特菌交叉感染给健康的不足一个月的健康婴儿[103]。这种细菌在环境中出现的相当普遍，它还在健康人群中以1%～15%的比例存在。环境、动物和人体来源的李斯特菌对食物中毒事件的影响比例还有待于进一步研究。

有人指出，食物中毒导致的李斯特菌病的突然增多可能是由于另一种病原菌（例如肠炎沙门氏菌 *Salmonella enteritidis*）感染了糖果造成的[24]。这种沙门氏菌在人体样品中的发生率与产单核细胞李斯特菌在人体中的发生率是平行的。也有人指出，大肠杆菌毒素能够加重来自胃肠道的感染[117]，而胃酸能够抑制或杀死侵入的细菌，但是使用抗酸剂会中和胃酸[67]。

22.7.3 发病症状

患李斯特菌病的患者并无特殊的系列症状出现，因为发病过程是因人而异的。无免疫缺陷的未怀孕的健康人对产单核细胞李斯特菌感染具有很强的抵抗力，很少有证据表明这样的健康人能够感染李斯特菌病。但是，已知在下述条件下容易诱发成人李斯特菌病，而且发病的死亡率很高：患肿瘤、艾滋病、酒精中毒、糖尿病（尤其是1型）、心血管病、肾脏移植者和可的松皮质激素治疗者。在有患病嫌疑的成人中，脑膜炎和脓血症是最常见的症状。在641例患者中，有73%的患者患了脑膜炎或脑炎。成人患病的症状还包括宫颈炎和常规淋巴结炎，因此这种病症可能与传染性的单核细胞增多症类似。脑脊髓液本身含有粒状细胞，但是在单核细胞增多症中，单核细胞占优势。怀孕的妇女感染此病（她们的胎儿常常被先天感染）后可能不会呈现任何症状，即使呈现症状时，其症状也比较温和、与流行感冒的症状类似。怀孕妇女感染李斯特菌病的结果常有流产、早

产或死胎。当新生儿在出生时被感染，李斯特菌病的症状典型的是脑膜炎，其典型的发病时间是在出生后的1～4周内，但4d后发病的也有记载报道。成人感染后的发病潜伏期一般是一至数周。在波上顿发病的20位患者中，有18人患有菌血症，8人并发了脑膜炎，有13人在发病症状出现之前声称有呕吐、腹痛和腹泻症状[66]。

产单核细胞李斯特菌在体内受到T-淋巴细胞和激活的巨噬细胞的控制，因此任何影响这些细胞发挥作用的不利条件都将使李斯特菌病的病情恶化。治疗这种病的最有效药物有香豆霉素、利福平和氨苄青霉素，而氨苄青霉素加上一种氨基糖苷抗菌素是最好的组合[34]。即使用这些治疗方法，李斯特菌病的抗菌素治疗方法还不能完全令人满意，因为患者和抵抗力低的人比抵抗力强的人难以治疗。

22.8 对李斯特菌病的抗性

对细胞内的病原（例如病毒、动物寄生虫和产单核细胞李斯特菌）的抗性或免疫力是通过T-细胞起作用的。T-细胞是由骨髓产生，并在胸腺中成熟的淋巴细胞［T来源于西文thymus（胸腺）的第一个字母］。与形成体液免疫性（产生循环抗体）的B-细胞不同的是，激活的T-细胞可以直接与外源细胞反应。一旦病原菌进入寄主细胞内时，循环抗体就无法接触到它，但是寄生细胞结构变化会给出病原菌存在的信息，这时激活T-细胞会摧毁这种被侵袭的寄主细胞，在这种情况下，寄主细胞不再被T-细胞认为是“自身”细胞。

巨噬细胞对T-细胞的作用是重要的，它们对于摧毁产单核细胞李斯特菌和某些其它细胞内病原菌是必需的，Mackeness[67]证实了这一观点。首先，巨噬细胞与产单核细胞李斯特菌细胞结合，并将它“引渡”给T-细胞，以至于T-细胞将它当作人侵者。当T-细胞与细菌作用时，T-细胞的体积增大，形成专门对付这种微生物的有机体或抗原。这些T-细胞激活以后，分泌白细胞介素-1（IL-1）。随着T-细胞的增殖，它们会形成不同类型的子代细胞。

能够抵抗李斯特菌病最重要的T-细胞子代类型是CD4（L3T4$^+$）或CD8（Lyt^{2-}）[79]。CD4 T-细胞先与外界抗原反应，然后产生淋巴激活素（细胞素）：IL-1、IL-2、IL-6、免疫蛋白或γ-干扰素和其它细胞素。肿瘤坏死因子有助于γ-干扰素的生成[22]。γ-干扰素诱导作用于单核细胞的IL-2受体的产生。IL-2可以促进（被淋巴激活素激活的）“杀菌子”细胞的激活，这种杀菌子能够溶解感染后的巨噬细胞。只要供给0.6μg/只老鼠的外源IL-2就能增强老鼠对产单核细胞李斯特菌的抵抗力[61]。γ-干扰素能够激活巨噬细胞和CD8 T-细胞，后者能与产单核细胞李斯特菌感染的寄主巨噬细胞反应，从而导致它们的溶解。CD4和CD8 T-细胞都可以由产单核细胞李斯特菌诱导产生，它们能通过产生γ-干扰素而激活巨噬细胞，从而对抵抗李斯特菌病产生作用[78]。CD8还能在供给外源IL-2的情况下分泌γ-干扰素，CD4和CD8都能为敏感的老鼠提供被动免疫能力[78]。

某些发生在鼠科动物中的产单核细胞李斯特菌感染被认为与发生在人类中的是一样的。当巨噬细胞吞噬了产单核细胞李斯特菌时，会在感染位点分泌一种产单核细胞促进因子（FIM）。这种促进因子转移到骨髓中后，会促进更多的巨噬细胞产生。只有活的产

单核细胞李斯特菌细胞能够诱导 T-细胞的响应，对李斯特菌病产生免疫性。李斯特菌溶血素 O 是诱发 T-细胞响应的产单核细胞李斯特菌毒性因子，这种耐热性的蛋白质只有在细胞被热致死之后才能失去活性。CD8 T-细胞亚组是负责抗李斯特菌病免疫性的主要 T-细胞组分，它是通过诱导巨噬细胞产生淋巴激活素而起作用的，输入 CD8 T-细胞可以获得对产单核细胞李斯特菌的被动免疫性[4]。在老鼠中注射死细胞和重组的 IL-1a 时，并不能导致 T-细胞的响应[68]。在体外试验中，不产毒细胞或死细胞都不能诱导 IL-1 产生，而产单核细胞李斯特菌活细胞可以诱导[105]，这表明 IL-1 和 γ-干扰素在引起动物体内响应方面的关键作用，因为有证据表明同时注射 IL-1a 和 γ-干扰素比单独注射一种物质能更好地增强老鼠对产单核细胞李斯特菌的抗性[83]。这种结合并没有协同作用，只有相加作用。γ-干扰素的主要作用似乎是诱导淋巴激活素的产生，而不是直接的作用。现在已知它能增加 IL-1 的产生量[38]。γ-干扰素只可以在老鼠感染之后前 4d 内的血流和肾脏中检测到[107]。产单核细胞李斯特菌感染老鼠后会导致 IL-6 含量的增加，这种白细胞介素是由非单淋巴细胞的细胞产生的[90]。具有 IL-6 缺陷的老鼠对李斯特菌病更为敏感[27]。IL-6 的作用似乎是促进噬中性粒细胞的产生[37]。

在鼠科动物对产单核细胞李斯特菌抗性的研究中，人们揭示了一些淋巴激活素在 T-细胞免疫方面的多种作用，并且搞清了李斯特菌溶血素 O 作为这种菌主要的毒性因子的重要性。使得有免疫缺陷的寄主对李斯特菌病更为敏感的因素是免疫抑制剂具有的对 T-细胞系统的衰减作用。某些淋巴激活素的特定作用可能有治疗效果，但是这些作用对人体是否有类似效果目前还不清楚。

22.9 食品中的产单核细胞李斯特菌

由于产单核细胞李斯特菌能够生长在很宽的温度范围（1～45℃）和 pH 范围（4.1～9.6）内，可以预计它们在食品中可能存活很长时间，这一点已经得到了证实。在农家干酪中接种 Scott A 和 V7 菌株 10^4～10^5/g 后，在 3℃下的存活时间可达 28d[121]。当这两个菌株和两个其它菌株以 10^4～10^5 的量接种到卡门伯特干酪中时，在干酪成熟过程的前 28d 出现了生长，有些菌株在干酪成熟的 65d 之后细胞水平达到了 10^6～10^7[120]。当接种量为 5×10^2/g 并储存在 4℃下时，产单核细胞李斯特菌能在冷包装（含有 0.30% 山梨酸的）干酪中平均存活 130d[119]。另一方面，在加工和储存脱脂乳粉过程中，喷雾干燥过程使得产单核细胞李斯特菌数量减少了 1～1.5 个对数单位，而在乳坯形成单元中于 25℃储存 16 周后，细菌数量减少了 4 个对数单位以上[32]。

在牛肉泥中接种 10^5～10^6 后，在 4℃下存放 14d 细菌数仍保持未变[27]，而在牛肉泥和肝浆中接种产单核细胞李斯特菌 10^3 或 10^5 后，在 30d 后也未变化，但是在这段时间中，标准的平板计数则增加了 3 倍至 6 倍[25,26]。当接种到含有 120mg/kg $NaNO_2$ 和 3% NaCl 的芬兰香肠中时，产单核细胞李斯特菌的初始数量在 21d 的发酵阶段之后仅仅降低了约 1 个对数单位[73]。当产单核细胞李斯特菌的 5 支菌株添加到 8 份加工的肉制品中，在 4.4℃储存 12 周之后，这些微生物在所有的产品上都有存活，并且在多数产品中的数量增加了 3～4 个对数单位[54]。产单核细胞李斯特菌在鸡肉和火鸡制品中生长最好，因为这

些产品的初始 pH 较高。在真空包装的牛肉中（包装膜的透气性能为 25～30mL/（m^2·24h·0.1MPa），接种的产单核细胞李斯特菌菌株在后背肉的脂肪组织中 16d 后增殖了约 4 个对数单位，而在储存于 5～5.5℃温度下的瘦肉中 20d 后增殖了约 3 个对数单位[54,55]。在肉类、干酪和鸡蛋馄饨中接种 3×10^5cfu/g Scott A 菌株后，在 5℃下存活了 14d[57]。在一份研究中，莴苣和莴苣汁支持了产单核细胞李斯特菌在 5℃下生长了 14d，这种菌还被从两份未接种的样品中分离了出来[136]。

上述研究对于其它李斯特菌也是类似的，它们代表了在食品中的存在情况，这些生态特性与在许多非食品环境中的状况是一致的。

22.10 与产单核细胞李斯特菌有关的食品法规

某些国家对微生物允许在食品（特别是熟食制品）中存在的数量建立了一些法规，而另一些国家只有一些指导性标准或并不具有法律效力的指标。

美国政府制定的政策最为严格，将产单核细胞李斯特菌称为“杂菌”（adulterant）。这意味着任何含有这种菌的熟食制品都被认为是杂菌污染物，因此可能受到取缔和/或查封。美国的要求是在 50g 样品中检测不出这种菌。“零含量”一般意味着在 25g 样品中检测不出这种菌，这相当于在一份样品检测程序中 $n=5$，$c=0$（具体解释可参阅第六部分 18）。下述概括的法规据认为在 1995 年底前有效，但是应意识到有些已经有所变化。

欧盟认为在乳和乳制品中，干酪中应该为零含量，而其它乳制品中 1g 样品中应该检测不出这种菌。

英国建立了一个临时性的指导标准，根据产单核细胞李斯特菌的含菌数将熟食制品分为 4 个质量组：25g 样品中检测不出为满意，$<10^2$/25g 为相当满意，10^2～10^4/25g 为不满意，$>10^5$/25g 为不可接受[50]。

加拿大在 1993 年根据产单核细胞李斯特菌的致病可能性将熟食制品分为三类：第一类包含与致病有关的产品，第二类包括货架期>10d 的产品，第三类包括支持李斯特菌生长但货架期≤10d 的产品或不支持这种菌生长的产品。其中最后一类应该符合下述一项或几项条件：pH5.0～5.5 和 $A_w<0.95$、pH<5.0 不限 A_w、$A_w\geq0.92$ 不限 pH、和冷冻食品[65]。若第三类食品中含菌数>10^2/g 就会被取缔。

德国认为，零含量不但是不现实的，也是不必要的。德国所规定的食品 4 级危险水平与加拿大的做法有点类似，产品的含菌数在>10^4/g 时则属于自动淘汰的范畴。

对于许多种 5×25g 干酪样品，澳大利亚要求不含产单核细胞李斯特菌。法国要求可能供给敏感人群的 25g 重的食品样品中应不含产单核细胞李斯特菌，但法国要求在食品原料中不含产单核细胞李斯特菌似乎是不现实的。

国际食品微生物规范委员会（ICMSF）似乎得出结论，如果食品在食用时的微生物数不超过 100/g，这种食品对于不敏感的人是可以接受的。ICMSF 制定了 HACCP 规范（参阅第六部分 19），将产单核细胞李斯特菌归类在第 10、11 和 12 类限制范畴（参阅第六部分 19 中表 19.6）。它们的样品检测程序为：第 10 类为 $n=5$，$c=0$，第 11 类为 $n=10$，$c=0$，第 12 类为 $n=20$，$c=0$。

参 考 文 献

[1] Ade, N., S. Steinmeyer, M. J. Loessner, H. Hof, and J. Kreft (Technical University of Munich, Weihenstephan, Freising, Germany). 1991. Personal communication.

[2] Anton, W. 1934. Kritisch-experimenteller Beitrag zur Biologie des *Bacterium monocytogenes*. Mit basonderer Berucksichtigung seiner Beziehung zur infektiosen Mononucleose des Menschen. *Zbl. Bakteriol Abt. I. Orig.* 131: 89～103.

[3] Audurier, A., and C. Martin. 1989. Phage typing of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 8: 251～257.

[4] Baldridge, J. R., R. A. Barry, and D. J. Hinrichs. 1990. Expression of systemic protection and delayed-type hypersensitivity to *Listeria monocytogenes* is mediated by different T-cell subsets. *Infect. Immun.* 58: 651～658.

[5] Bartlett, F. M., and A. E. Hawke. 1995. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A and HAL 957E1 in various liquid egg products. *J. Food Protect.* 58: 1211～1214.

[6] Sneath, P. M. A., N. S. Mair, M. E. Sharpe, and J. G. Holt. 1986. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, *Vol.* 2. Baltimore, MD: Williams & Wilkins.

[7] Beuchat, L. R., and R. E. Brackett. 1989. Observations on survival and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in ravioli. *Lett. Appl. Microbiol.* 8: 173～175.

[8] Beuchat, L. R., R. E. Brackett, D. Y. -Y. Hao, and D. E. Conner. 1986. Growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* in cabbage and cabbage juice, *Can J. Microbiol.* 32: 791～795.

[9] Boyle, D. L., J. N. Sofos, and G. R. Schmidt, 1990. Thermal destruction of *Listeria monocytogenes* in a meat slurry and in ground beef. *J. Food Sci.* 55: 327～329.

[10] Bradshaw, J. G., J. T. Peeler, J. J. Corwin, J. M. Hunt, and R. M. Twedt. 1987. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *J. Food Protect.* 50: 543～544.

[11] Boerlin, P., J. Rocourt, F. Grimont, P. A. D. Grimont, C. Jacquet, and J. -C. Piffaretti. 1992. *Listeria ivanovii* subsp. *londoniensis* subsp. nov. *Int. J. System. Bacteriol.* 42: 69～73.

[12] Bradshaw, J. G., J. T. Peeler, J. J. Corwin, J. M. Hunt, J. T. Tierney, E. P. Larkin, and R. M. Twedt. 1985. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in milk. *J. Food Protect*, 48: 743～755.

[13] Buchanan, R. L., and L. A. Klawitter. 1990. Effects of temperature and oxygen on the growth of *Listeria monocytogenes* at pH 4. 5. *J. Food Sci.* 55: 1754～1756.

[14] Bunning, V. K., R. G. Crawford, J. T. Tierney, and J. T. Peeler. 1990. Thermotolerance of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella typhimurium* after sublethal heat shock. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3216～3219.

[15] Bunning, V. K., C. W. Donnelly, J. T. Peeler, E. H. Briggs, J. G. Bradshaw, R. G. Crawford, C. M. Beliveau, and J. T. Tierney. 1988. Thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* within bovine milk phagocytes. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 364～370.

[16] Bunning, V. K., R. G. Crawford, J. G. Bradshaw, J. T. Peeler, J. T. Tierney, and R. M. Twedt. 1986. Thermal resistance of intracellular *Listeria monocytogenes* cells suspended in raw

bovine milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 1398～1402.

17] Carbonnelle, B., J. Cottin, F. Parvery, G. Chambreuil, S. Kouyoumdjian, M. LeLirzin, G. Cordier, and F. Vincent, 1978. Epidemic de listeriose dans l'Ouest de la France (1975～1976). *Rev. Epidem. Santé Pub.* 26 : 151～167.

[18] Chen, Y., A. Nakane, and T. Minagawa. 1989. Recombinant murine gamma interferon induces enhanced resistance to *Listeria monocytogenes* infection in neonatal mice. *Infect. Immun.* 57 : 2345～2349.

[19] Colburn, K. G., C. A. Kaysner, C. Abeyta. Jr., and M. M. Wekell. 1990. *Listeria* species in a California coast estuarine environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 2007～2011.

[20] Cole, M. B., M. V. Jones, and C. Holyoak. 1990. The effect of pH, salt concentration and temperature on the survival and growth of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 63～72.

[21] Conner, D. E., R. E. Brackett, and L. R. Beuchat. 1986. Effect of temperature, sodium chloride, and pH on growth of *Listeria monocytogenes* in cabbage juice, *Appl. Environ. Microbiol.* 52 : 59～63.

[22] Cossart, P., and J. Mengaud. 1989. *Listeria monocytogenes*. A model system for the molecular study of intracellular parasitism. *Mol. Biol. Med.* 6 : 463～474.

[23] Cossart, P., M. F. Vicente, J. Mengaud, F. Baquero, J. C. Perez-Diaz, and P. Berche. 1989. Listeriolysin O is essential for virulence of *Listeria monocytogenes*: Direct evidence obtained by gene complementation. *Infect. Immun.* 57 : 3629～3636.

[24] Cox, L. J. 1989. A perspective on listeriosis. *Food Technol.* 43 (12) : 52～59.

[25] Dalrymple, S. A., L. A. Lucian, R. Slattery, T. McNeil, D. M. Aud, S. Fuchino, F. Lee, and R. Murray. 1995. Interlukin-6-deficient mice are highly susceptible to *Listeria monocytogenes* infection: Correlation with inefficient neutrophilia. *Infect. Immun.* 63 : 2262～2268.

[26] Datta, A. R., and M. H. Kothary. 1993. Effects of glucose, growth temperature and pH on listeriolysin O production in *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59 : 3195～3497.

[27] Del Corral, F., R. L. Buchanan, M. M. Bencivengo, and P. H. Cooke. 1990. Quantitative comparison of selected virulence associated characteristics in food and clinical isolates of *Listeria*. *J. Food Protect.* 53 : 1003～1009.

[28] Dominguez Rodriguez, L., J. F. Fernandez Garayzabal, J. A. Vazquez Boland, E. Rodriguez Ferri, and G. Suarez Fernandez. 1985. Isolation de micro-organismes du genre *Listeria* à partir de lait cru destine à la consommation humaine. *Can. J. Microbiol.* 31 : 938～941.

[29] Donnelly, C. W. 1994. *Listeria monocytogenes*. In *Foodborne Disease Handbook*, eds, Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murrell, and D. O. Cliver, vol. 1, 215～252. New York: Marcel Dekker.

[30] Donnelly, C. W., and E. H. Briggs. 1986. Psychrotrophic growth and thermal inactivation of *Listeria monocytogenes* as a function of milk composition. *J. Food Protect.* 49 : 994～998.

[31] Donnelly, C. W., E. H. Briggs, and G. J. Baigent. 1986. Analysis of raw milk for the epidemic serotype of *Listeria monocytogenes* linked to an outbreak of listeriosis in Calitornia. *J. Food protect.* 49 : 846～817 (Abstract).

[32] Doyle, M. P., L. M. Meske, and E. H. Marth. 1985. Survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and storage of nonfat dry milk. *J. Food Protect.* 48 : 740～742.

[33] Drevets, D. A., R. T. Sawyer, T. A. Potter, and P. A. Campbell. 1995. *Listeria monocytogenes*

infects human endothelial cells by two distinct mechanisms. *Infect. Immun.* 63 : 4268～4276.

[34] Espaze, E. P., and A. E. Reynaud. 1988. Antibiotic susceptibilities of *Listeria*: In vitro studies. *Infection* 16 (Suppl. 2) : 160～164.

[35] Farber, J. M., F. Coates, and E. Daley. 1992. Minimum water activity requirements for the growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 15 : 103～105.

[36] Farber, J. M., and B. E. Brown. 1990. Effect of prior heat shock on heat resistance of *Listeria monocytogenes* in meat. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1584～1587.

[37] Farber, J. M. 1989. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes*. *Int. J. Food Microbiol.* 8 : 285～291.

[38] Farber, J. M., G. W. Sanders, J. I. Speirs, J. -Y. D'Aoust, D. B. Emmons, and R. McKellar, 1988. Thermal resistance of *Listeria monocytogenes* in inoculated and naturally contaminated, raw milk. *Int. J. Food Microbiol.* 7 : 277～286.

[39] Fedio, W. M., and H. Jackson. 1989. Effect of tempering on the heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9 : 157～160.

[40] Fenlon, D. R. 1985. Wild birds and silage as reservoirs of *Listeria* in the agricultural environment. *J. Appl. Bacteriol.* 59 : 537～543.

[41] Fenlon, D. R., T. Stewart, and W. Donachie. 1995. The incidence, numbers and types of *Listeria monocytogenes* isolated from farm bulk tank milks. *Lett. Appl. Microbiol.* 20 : 57～60.

[42] Foegeding, P. M., and N. W. Stanley. 1990. *Listeria monocytogenes* F5069 thermal death times in liquid whole egg. *J. Food Protect.* 53 : 6～8.

[43] Gaillard, J. L., P. Berche, and P. Sansonetti. 1986. Transposon mutagenesis as a tool to study the role of hemolysin in the virulence of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 52 : 50～55.

[44] Galsworthy, S. B., and D. Fewster. 1988. Comparison of responsiveness to the monocytosis producing activity of *Listeria monocytogenes* in mice genetically susceptible of resistant to listeriosis. *Infection* 16 (Suppl. 2) : 118～122.

[45] Gaze, J. E., G. B. Brown, D. E. Gaskell, and J. G. Banks. 1989. Heat resistance of *Listeria monocytogenes* in homogenates of chicken, beef, steak and carrot. *Food. Microbiol.* 62 : 251～259.

[46] Genigeorgis, C. A., P. Oanca, and D. Dutulescu. 1990. Prevalence of *Listeria* spp. in turkey meat at the supermarket and slaughterhouse level. *J. Food Protect.* 53 : 282～288.

[47] Geoffroy, C., J. L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche. 1989. Production of thiol-dependent haemolysins by *Listeria monocytogenes*. *J. Gen. Microbiol.* 135 : 481～487.

[48] Geoffroy, C., J. -L. Gaillard, J. E. Alouf, and P. Berche. 1987. Purification, characterization, and toxicity of the sulfhydryl- activated hemolysin listeriolysin O from *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 55 : 1641～1646.

[49] George, S. M., B. M. Lund, and T. F. Brocklehurst. 1988. The effect of pH and temperature on initiation of growth of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 6 : 153～156.

[50] Gilbert, R. J. 1992. Provisional microbiological guidelines for some ready-to-eat foods sampled at point of sale; Notes for PHLS Food Examiners. *Pub. Hlth. Serv. Lab. Quart.* 9 : 98～99.

[51] Gilbert, R. J., and P. N. Pini. 1988. Listeriosis and food borne transmission. *Lancet* i : 472～473.

[52] Girard, K. F., A. J. Sbarra, and W. A. Bardawil. 1963. Serology of *Listeria monocytogenes*.

I. Characteristics of the soluble hemolysin. *J. Bacteriol.* 85 : 349～355.

[53] Gitter, M., R. Bradley, and P. H. Blampied. 1980. *Listeria monocytogenes* infection in bovine mastitis. *Vet. Rec.* 107 : 390～393.

[54] Glass, K. A., and M. P. Doyle. 1990. Fate of *Listeria monocytogenes* in processed meat products during refrigerated storage. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1565～1569.

[55] Golnazarian, C. A., C. W. Donnelly, S. J. Pintauro, and D. B. Howard. 1989. Comparison of infectious dose of *Listeria monocytogenes* F5817 as determined for normal versus compromised C57B1/6J mice. *J. Food Protect.* 52 : 696～701.

[56] Grau, F. H., and P. B. Vanderlinde. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* on vacuumpackaged beef. *J. Food Protect.* 53 : 739～741.

[57] Gray, M. L. 1963. *2nd Symposium on Listeric Infection.* Bozeman: Montana State College.

[58] Gray, M. L., and A. H. Killinger, 1966. *Listeria monocytogenes* and listeric infections. *Bacteriol. Rev.* 30 : 309～382.

[59] Green, S. S. 1990. *Listeria monocytogenes* in meat and poultry products. Interim Rept. to Nat'l Adv. Comm. Microbiol. Spec. Foods. FSIS/USDA, Nov. 27.

[60] Groves, R. D., and H. J. Welshimer, 1977. Separation of pathogenic from apathogenic *Listeria monocytogenes* by three in vitro reactions. *J. Clin. Microbiol.* 5 : 559～563.

[61] Haak-Frendscho, M., K. M. Young, and C. J. Czuprynski. 1989. Treatment of mice with human recombinant interleukin-2 augments resistance to the facultative intracellular pathogen *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 57 : 3014～3021.

[62] Harrison, M. A., and Y. -W. Huang. 1990. Thermal death times for *Listeria monocytogenes* (Scott A) in crabmeat. *J. Food Protect.* 53 : 878～880.

[63] Heisick, J. E., D. E. Wagner, M. L. Nierman, and J. T. Peeler. 1989. *Listeria* spp. found on fresh market product. *Appl. Environ. Microbiol.* 55 : 1925～1927.

[64] Hether, N. W., and L. L. Jackson. 1983. Lipoteichoic acid from *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 156 : 809～817.

[65] Hird, D. W. 1987. Review of evidence for zoonotic listeriosis. *J. Food Protect.* 50 : 429～433.

[66] Ho, J. L., K. N. Shands, G. Friedland, P. Eckind, and D. W. Fraser. 1986. An outbreak of type 4b *Listeria monocytogenes* infection involving patients from eight Boston hospitals. *Arch. Intern. Med.* 146 : 520～524.

[67] Hof, H., and P. Hefner. 1988. Pathogenicity of *Listeria monocytogenes* in comparison to other *Listeria* species. *Infection* 16 (Suppl. 2) : 141～144.

[68] Igarashi, K. I., M. Mitsuyama, K. Muramori, H. Tsukada, and K. Nomoto. 1990. Interleukin-1-induced promotion of T-cell differentiation in mice immunized with killed *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 58 : 3973～3979.

[69] Jenkins, E. M., A. N. Njoku-O'oi, and E. W. Adams, 1964. Purification of soluble hemolysins of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 88 : 418～424.

[70] Johnson, J. L., M. P. Doyle, and R. G. Cassens. 1990. *Listeria monocytogenes* and other Listeria spp. in meat and meat products. A. review. *J. Food Protect.* 53 : 81～91.

[71] Johnson, J. L., M. P. Doyle, and R. G. Cassens. 1988. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef. *Int. J. Food. Microbiol.* 6 : 243～247.

[72] Jones, D. 1988. The place of *Listeria* among gram-positive bacteria. *Infection* 16 (Suppl. 2) :

85～88.

[73] Junttila, J., J. Hirn. P. Hill. and E. Nurmi. 1989. Effect of different levels of nitrite and nitrate on the survival of *Listeria monocytogenes* during the manufacture of fermented sausage. *J. Food. Protect.* 52：158～161.

[74] Junttila, J. R., S. I. Niemela, and J. Hirn. 1988. Minimum growth temperatures of *Listeria monocytogenes* and nonhaemolytic listeria. *J. Appl. Bacteriol.* 65：321～327.

[75] Kampelmacher, E. H., and L. M. Van Nooble Jansen. 1969. Isolation of *Listeria monocytogenes* from faeces of clinically healthy humans and animals. *Zentral. Bakt. Inf. Abt. Orig.* 211：353～359.

[76] Karunasagar, I., G. Krohne, and W. Goebel. 1993. *Listeria ivanovii* is capable of cell-to cell spread involving actin polymerization. *Infect. Immun.* 61：162～169.

[77] Kathariou, S., P. Metz. H. Hof, and W. Goebel. 1987. Tn916-induced mutations in the hemolysin determinant affecting virulence of *Listeria monocytogenes*. *J. Bacteriol.* 169：1291～1297.

[78] Kaufmann, S. H. E. 1988. *Listeria monocytogenes* specific T-cell lines and clones. *Infection* 16 (Suppl. 2)：128：136.

[79] Kaufmann, S. H. E. E. Hug, C. Vath, and I. Muller. 1985. Effective protection against *Listeria monocytogenes* and delayed-type hypersensitivity to listerial antigens depend on cooperation between specific L3T4+and Lyt2 +T cells. *Infect. Immun.* 48：263～266.

[80] Kingdom. G. C., and C. P. Sword. 1970. Effects of *Listeria monocytogenes* hemolysin on phagocytic cells and lysosomes. *Infect. Immun.* 1：356～362.

[81] Kouassi, Y. and L. A. Shelef. 1995. Listeriolysin O secretion by *Listeria monocytogenes* in broth containing salts of organic acids *J. Food Protect.* 58：1314～1319.

[82] Kreft, J., D. Funke, A. Haas. F. Lottspeich, and W. Goebel. 1989. Production, Purification and characterization of hemolysins fron *Listeria ivanovii* and *Listeria monocytogenes* Sv4b. *FEMS Microbiol. Lett.* 57：197～202.

[83] Kurtz, R. S., K. M. Young, and C. J. Czuprynski. 1989. Separate and combined effects of recombinant interleukin la and gamma interferon on antibacterial resistance. *Infect, Immun.* 57：553～558.

[84] Kwantes, W., and M. Isaac. 1971. Listeriosis. *Brit. Med. J.* 4：296～297.

[85] Leasor, S. B., and P. M. Foegeding. 1989. *Listeria* species in commercially broken raw liquid whole egg. *J. Food Protect.* 52：777～780.

[86] Lammerding, A. M., and J. M. Farber. 1994. The status of *Listeria monocytogenes* in the Canadian food industry. *Dairy Food Environ. Sanit.* 14：146～150.

[87] Leimeister-Waechter, M., and T. Chakraborty. 1989. Detection of listeriolysin, the thioldependent hemolysin in *Listeria monocytogenes*, *Listeria ivanovii*, and *Listeria seeligeri*. *Infect. Immun.* 57：2350～2357.

[88] Lingnau. A., E. Domann, M. Hudel, M. Bock, T. Nichterlein, J. Wehland, and T. Chakraborty. 1995. Expression of the *Listeria monocytogenes* EGD *in* 1*A* and *in* 1*B* genes, whose products mediate bacterial entry into tissue culture cell lines, by PrfA-dependent and-independent mechanisms. *Infect. Immun.* 63：3896～3903.

[89] Linton, R. H., M. D. Pierson, and J. R. Bishop. 1990. Increase in heat resistance of *Listeria monocytogenes* Scott A by sublethal heat shock. *J. Food Protect.* 53：924～927.

[90] Liu, Z., and C. Cheers. 1993. The cellular source of interleukin-6 during *Listeria* infection. *Infect. Immun.* 61 : 2626～2631.

[91] Loessner, M. J., and M. Busse. 1990. Bacteriophage typing of *Listeria* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1912～1918.

[92] Lovett, J., I. V. Wesley, M. J. Vandermaaten, J. G. Brawshaw, D. W. Francis, R. G. Crawford. C. W. Donnelly. and J. W. Messer. 1990. High-temperature short-time pasteurization inactivates *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 53 : 734～738.

[93] Lovett, J. 1988. Isolation and identification of *Listeria monocytogenes* in dairy products. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 71 : 658～660.

[94] Lovett, J. D. W. Francis, and J. M. Hunt. 1987. *Listeria monocytogenes* in raw milk : Detection, incidence, and pathogenicity. *J. Food Protect.* 50 : 188～192.

[95] Ludwig, W., K. -H. Schleifer, and E. Stackebrandt. 1984. 16S rRNA analysis of *Listeria monocytogenes* and *Brochothrix thermosphacta*. *FEMS Microbiol. Lett.* 25 : 199～204.

[96] Lund, B. M., M. R. Knox, and M. B. Cole. 1989. Destruction of *Listeria monocytogenes* during microwave cooking. *Lancet* i : 218.

[97] Mackeness, G. B. 1971. Resistance to intracellular infection. *J. Infect. Dis.* 123 : 439～445.

[98] Mackey, B. M., C. Pritchet, A. Norris, and G. C. Mead. 1990. Heat resistance of *Listeria* : Strain differences and effects of meat type and curing salts. *Lett. Appl. Microbiol.* 10 : 251～255

[99] Mackey, B. M., and N. Bratchell. 1989. The heat resistance of *Listeria monocytogenes*. *Lett. Appl. Microbiol.* 9 : 89～94.

[100] Malinverni, R., J. Bille, Cl. Perret, F. Regli, F. Tanner, and M. P. Glauser. 1985. Listeriose epidemique. Observation de 25 cas en 15 mois au Centre hospitalier universitaire vaudois. *Schweiz. Med. Wschr.* 115 : 2～10.

[101] McKellar, R. C. 1994. Use of the CAMP test for identification of *Listeria monocytogenes*. *Appl. Environ. Microbiol.* 60 : 4219～4225.

[102] McLauchlin, J. 1987. *Listeria monocytogenes*, recent advances in the taxonomy and epidemiology of listeriosis in humans. *J. Appl. Bacteriol.* 63 : 1～11.

[103] McLauchlin, J., A. Audurier, and A. G. Taylor. 1986. Aspects of the epidemiology of human *Listeria monocytogenes* infections in Britain 1967-1984. The use of serotyping and phagetyping. *J. Med. Microbiol.* 22 : 367～377.

[104] Mengaud, J., M. F. Vincente, J. Chenevert, J. M. Pereira, C. Geoffroy, B. Gicquel-Sanzey, F. Baquero, J. -C. Perez-Diaz, and P. Cossart. 1988. Expression in *Escherichia coli* and sequence analysis of the listeriolysin O determinant of *Listeria monocytogenes Infect. Immun.* 56 : 766～772.

[105] Mitsuyama, M., K. -I. Igarashi, I. Kawamura, T. Ohmori, and K. Nomoto. 1990. Difference in the induction of macrophage interleukin-1 production between viable and killed cells of *Listeria monocytogenes*. *Infect. Immun.* 58 : 1254～1260.

[106] Murray, E. G. D., R. A. Webb, and M. B. R. Swann. 1926. A disease of rabbits characterized by large mononuclear leucocytosis caused by a hitherto undescribed bacillus *Bacterium monocytogenes* (n. sp.). *J. Pathol. Bacteriol.* 29 : 407～439.

[107] Nakane, A., A. Numata, M. Asano, M. Kohanawa, Y. Chen, and T. Minagawa. 1990.

Evidence that endogenous gamma interferon is produced early in *Listeria monocytogenes* infection. *Infect. Immun.* 58 : 2386～2388.

[108] Nicolas, J. -A., and N. Vidaud. 1987. Contribution a l'étude des *Listeria* presentés dans les denrées d'origine animale destinées à la consommation humaine. *Rec. Med. Vet.* 163 (3) : 283～285.

[109] Njoku-Obi, A. N., E. M. Jenkins, J. C. Njoku-Obi, J. Adams, and V. Covington. 1963. Production and nature of *Listeria monocytogenes* hemolysins. *J. Bacteriol.* 86 : 1～8.

[110] Njoku-Obi, A. N., and J. W. Osebold. 1962. Studies on mechanisms of immunity of listeriosis. I. Interaction of peritoneal exudate cells from sheep with *Listeria monocytogenes* in vitro. *J. Immunol.* 89 : 187～194.

[111] Parish, M. E., and D. P. Higgins. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in low pH model broth systems. *J. Food. Protect.* 52 : 144～147.

[112] Petran, R. L., and E. A. Zottola. 1989. A study of factors affecting growth and recovery of *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Sci.* 54 : 458～460.

[113] Piccinin, D. M., and L. A. Shelef. 1995. Survival of *Listeria monocytogenes* in cottage cheese. *J. Food Protect.* 58 : 128～131.

[114] Pine, L., G. B. Malcolm, and B. D. Plikaytis. 1990. *Listeria monocytogenes* intragastric and intraperitoneal approximate 50% lethal doses for mice are comparable , but death occurs earlier by intragastric feeding. *Infect. Immun.* 58 : 2940～2945.

[115] Pini, P. N., and R. J. Gilbert. 1988. The occurrence in the U. K. of *Listeria* species in raw chickens and soft cheeses. *Int. J. Food Microbiol.* 6 : 317～326.

[116] Rocourt, J., P. Boerlin, F. Grimont, C. Jacquet, and J. -C. Piffaretti. 1992. Assignment of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *Int. J. System. Bacteriol.* 42 : 171～74.

[117] Rolle, M., and H. Mayer. 1956. Zur Pathogenese der Listeriose. *Zentral Bakteriol. Abt. I. Orig.* 166 : 479～483.

[118] Ruhland, G. J., and F. Fiedler. 1987. Occurrence and biochemistry of lipoteichoic acids in the genus *Listeria*. *System. Appl. Microbiol.* 9 : 40～46.

[119] Ryser, E. T., and E. H. Marth. 1988. Survival of *Listeria monocytogenes* in cold-pack cheese food during refrigerated storage. *J. Food Protect.* 51 : 615～621.

[120] Ryser, E. T., and E. H. Marth. 1987. Fate of *Listeria monocytogenes* during the manufacture and ripening of camembert cheese. *J. Food Protect.* 50 : 372～378.

[121] Ryser, E. T., E. H. Marth, and M. P. Doyle. 1985. Survival of *Listeria monocytogenes* during manufacture and storage of cottage cheese. *J. Food Protect.* 48 : 746～750.

[122] Schmidt, U., H. P. R. Seeliger, E. Glenn, B. Langer, and L. Leistner. 1988. Listerienfunde in rohen Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch.* 68 : 1313～1316.

[123] Schuchat, A., M. Swaminathan, and C. V. Broome. 1991. Epidemiology of human listeriosis. *Clin. Microbiol. Rev.* 4 : 169～183.

[124] Seeliger, H. P. R. 1961. *Listeriosis*. 2d ed. New York : Hafner.

[125] Seeliger, H. P. R., and K Höhne. 1979. Serotyping of *Listeria monocytogenes* and related species. *Meth. Microbiol.* 13 : 31～49.

[126] Shelef, L. A. 1989. Survival of *Listeria monocytogenes* in ground beef or liver during storage at 4°and 25°C. *J. Food Protect.* 52 : 379～383.

[127] Singh, S. P., B. L. Moore, and I. H. Siddique. 1981. Purification and further characterization of phenol extract from *Listeria monocytogenes*. *Amer. J. Vet. Res.* 42 : 1266～1268.

[128] Sizmur, K., and C. W. Walker. 1988. *Listeria* in prepackaged salads. *Lancet* i : 1167.

[129] Skalka, B., J. Smola, and K. Elischerova. 1982. Routine test for in vitro differentiation of pathogenic and apathogenic *Listeria monocytogenes* strains. *J. Clin. Microbiol.* 15 : 503～507.

[130] Skovgaard, N., and C. -A. Morgen. 1988. Detection of *Listeria* spp. in faeces from animals, in feeds, and in raw foods of animal origin. *Int. J. Food Microbiol.* 6 : 229～242.

[131] Slade, P. J., D. L. Collins-Thompson, and F. Fletcher. 1988. Incidence of *Listeria* species in Ontario raw milk. *Can. Inst. Food Sci. Technol. J.* 21 : 425～429.

[132] Smith, G. A., H. Marquis, S. Jones. N. C. Johnston, D. A. Portnoy, and H. Goldfine. 1995. The two distinct phospholipases C of *Listeria monocytogenes* have overlapping roles in escape from a vacuole and cell-to-cell spread. *Infect. Immun.* 63 : 4231～4327.

[133] Sörqvist, S. 1994. Heat resistance of different serovars of *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Bacteriol.* 76 : 383～388.

[134] Sorrells, K. M., D. C. Enigl, and J. R. Hatfield. 1989. Effect of pH, acidulant, time, and temperature on the growth and survival of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Protect.* 52 : 571～573.

[135] Stanley, N. F. 1949. Studies on *Listeria monocytogenes*. 1. Isolation of a monocytosis-producing agent (MPA). *Aust. J. Expt. Biol. Med.* 27 : 123～131.

[136] Steinbruegge, E. G., R. B. Maxcy, and M. B. Liewen. 1988. Fate of *Listeria monocytogenes* on ready to serve lettuce *J. Food Protect.* 51 : 596～599.

[137] Terplan, G., and S. Steinmeyer. 1989. Investigations on the pathogenicity of *Listeria* spp. by experimental infection of the chick embryo. *Int. J. Food Microbiol.* 8 : 277～280.

[138] Uchikawa, K., I. Sekikawa, and I. Azuma. 1986. Structural studies on lipoteichoic acids from four *Listeria* strains. *J. Bacteriol.* 168 : 115～122.

[139] Vazquez-Boland, J. -A., L. Dominguez. E. -F. Rodriguez-Ferri, and G. Suarez. 1989. Purification and characterization of two *Listeria ivanovii* cytolysins, a sphingomyelinase C and a thiol-activated toxin (ivanolysin O). *Infect. Immun.* 57 : 3928～3935.

[140] Weagant, S. D., P. N. Sado, K. G. Colburn, J. D. Torkelson. F. A. Stanley, M. H. Krane, S. C. Shields, and C. F. Thayer. 1988. The incidence of *Listeria* species in frozen seafood products. *J. Food Protect.* 51 : 655～657.

[141] Weis. J., and H. P. R. Seeliger. 1975. Incidence of *Listeria monocytogenes* in nature. *Appl. Microbiol.* 30 : 29～32.

[142] Welshimer, H. J. 1960. Survival of *Listeria monocytogenes* in soil. *J. Bacteriol.* 80 : 316～320.

[143] Wesley. I. V., R. D. Wesley, J. Heisick, F. Harrel, and D. Wagner. 1990. Restriction enzyme analysis in the epidemiology of *Listeria monocytogenes*. In *Symposium on Cellular and Molecular Modes of Action of Selected Microbial Toxins in Foods and Feeds*, ed. J. L. Richard, 225～238. New York : Plenum.

[144] Wexler, H., and J. D. Oppenheim. 1979. Isolation, characterization, and biological properties of an endotoxin-like material from the gram-positive organism *Listeria monocytogenes*. *Infect. Im-*

mun. 23：845～857.

[143] Zaika, L. L., S. A. Palumbo, J. L. Smith, F. Del Corral, S. Bhaduri, C. O. Jones, and A. H. Kim. 1990. Destruction of *Listeria monocytogenes* during frankfurter processing. *J. Food Protect.* 53：18～21.

23. 沙门氏菌和志贺氏菌食物中毒胃肠炎

在导致食物中毒胃肠炎的革兰氏阴性杆菌中，最重要的是沙门氏菌属（*Salmonella*）的成员。本部分将讨论沙门氏菌引起的各种病症。这些微生物在食品中的出现情况可以参阅第三部分内容。

23.1 沙门氏菌病

沙门氏菌科（*Salmonellae*）是一个很小的科，它们是不产孢子革兰氏阴性的杆形菌，在普通显微镜下或普通营养培养基中不能与大肠杆菌（*E. coli*）进行区分。它们在自然界分布广泛，人体和动物体是它们的主要栖息地。沙门氏菌食物中毒来源于食用了含有大量含毒菌株的食品。

在沙门氏菌科的分类上发生了一些重大的变化。虽然食品微生物学家、食品工艺学家和流行病学家将沙门氏菌 2 324 种血清型的每一种看作一个菌种，但是所有的沙门氏菌只被归类于 2 个种：肠道沙门氏菌（*S. enterica*）和波哥沙门氏菌（*S. bongori*），又被分成 5 个亚种或组，多数菌被归类为肠道沙门氏菌[37]。主要的组对应于下述亚种：第Ⅰ组肠道沙门氏菌塞拉姆亚种（*S. enterica* subsp. *salamae*）；第Ⅲa 组肠道沙门氏菌亚利桑那亚种（*S. enterica* subsp. *arizonae*）；第Ⅲb 组肠道沙门氏菌双亚利桑那亚种（*S. enterica* subsp. *diarizonae*）；第Ⅳ组肠道沙门氏菌豪顿亚种（*S. enterica* subsp. *houtenae*）；和第Ⅵ组肠道沙门氏菌印度亚种（*S. enterica* subsp. *indica*）。其中的前 5 组被升格为种，例如波哥沙门氏菌[5,7]。这些变化是根据这些菌的 DNA-DNA 杂交与多点酶电泳的性质来制定的（参阅第四部分）。如果完全采用这样的分类方案，以前在长期实践中根据沙门氏菌血清型分类的方法就不再有效了。例如，鼠伤寒沙门氏菌（*S. typhimurium*）应该是鼠伤寒血清型的肠道沙门氏菌或者是沙门氏鼠伤寒菌。尽管如此，本书中还是将血清型作为种的分类依据。

从病原学角度来看，可以将沙门氏菌分成下述 3 个组：

①只感染人类的菌：包括伤寒沙门氏菌（*S. typhi*）、副伤寒 A 沙门氏菌（*S. paratyphi* A）、副伤寒 C 沙门氏菌（*S. paratyphi* C）。这组包括伤寒热和副伤寒热的病原菌，这两种病在所有沙门氏菌引发的疾病中是最厉害的。伤寒热潜伏时间最长、导致发热的体温最高、致死率也最高。伤寒沙门氏菌可以在肠道发热之前从患者的血液和（有时）从粪便、尿中分离出来。副伤寒热的症状比伤寒热要温和一些。

②寄主适应血清型（其中有些是人类病原菌，可以由食物中毒引起）：包括鸡沙门氏菌（*S. gallinarum*）（感染家禽）、都柏林沙门氏菌（*S. dublin*）（感染牛）、马流产沙门氏菌（*S. abortus-equi*）（感染马）、羊流产沙门氏菌（*S. abortus-ovis*）（感染羊）和猪霍乱沙门氏菌（*S. choleraesuis*）（感染猪）。

③非适应血清型（非寄主型）：这些是人类和其它动物的病原菌，它们包括多数食物来源的血清型。食物来源的沙门氏菌病将在后面讨论。

23.1.1 沙门氏菌的血清型

单兰氏阴性菌的血清型已经在第四部分 11 中讨论过。应用这种方法时，沙门氏菌的菌种和血清型可根据一种或多种 O 抗原的类似性归类于 A、B、C 等类型。这样，丙型副伤寒沙门氏菌（*S. hirschfeldii*）、猪霍乱沙门氏菌、奥兰宁堡沙门氏菌（*S. oranienberg*）和蒙德维的亚沙门氏菌（*S. montevideo*）被归类于 C 组，因为它们都含有 O 抗原 6 和 7。新港沙门氏菌（*S. newport*）由于具有 O 抗原 K 和 8 而被归类于 C_2 组（表 23.1）。进一步的分类需要采用鞭毛或 H 抗原。这些抗原分为两种期型：专一期型（期型 1）和组类期型（期型 2）。期型 1 抗原只在沙门氏菌的少数其它菌种或变种之间相同。期型 2 抗原可能较广泛地分布在数种菌之间。任何沙门氏菌的培养物都只能有一种期型或两种鞭毛期型的细胞组成。期型 1 的 H 抗原用小写字母表示，期型 2 用阿拉伯数字表示。这样猪霍乱沙门氏菌的完全抗原分析如下：6，7，c，1，5，其中 6 和 7 表示 O 抗原，c 表示期型 1 鞭毛抗原，1 和 5 表示期型 2 鞭毛抗原（表 23.1）。这种类型的沙门氏菌亚组是根据血清型区分的。其中具有 O 抗原、期型 1 抗原和期型 2 抗原的类型较少，而且可能出现比较大的变化，从而可能出现为数众多的血清型。

表 23.1　　某些普通沙门氏菌的抗原结构

组别	菌种/血清型	拉丁名称	O 抗原[a]	H 抗原	
				期型 1	期型 2
A	副伤寒 A 沙门氏菌	*S. paratyphi* A	*1*，2，12	a	(1，5)
B	乙型副伤寒沙门氏菌	*S. schottmuelleri*	*1*，4，(5)，12	b	1，2
	鼠伤寒沙门氏菌	*S. typhimurium*	*1*，4，(5)，12	i	1，2
C_1	丙型副伤寒沙门氏菌	*S. hirschfeldii*	6，7，(vi)	c	1，5
	猪霍乱沙门氏菌	*S. choleraesuis*	6，7	(c)	1，5
	奥兰宁堡沙门氏菌	*S. oranienburg*	6，7	m，t	—
	蒙德维的亚沙门氏菌	*S. montevideo*	6，7	g，m，s (p)	(1，2，7)
C_2	新港沙门氏菌	*S. newport*	6，8	e，h	1，2
D	伤寒沙门氏菌	*S. typhi*	9，12，(Vi)	d	-
	肠炎沙门氏菌	*S. enteritidis*	*1*，9，12	g，m	(1，7)
	鸡沙门氏菌	*S. gallinarum*	*1*，9，12		—
E_1	鸭沙门氏菌	*S. anatum*	3，10	e，h	1，6

注：（ ）为可能不存在；

[a] 斜体字的抗原可能与噬菌体的转化有关。

沙门氏菌是根据国际协议命名的。在国际命名系统下，沙门氏菌的种名多用最先发

现的地点命名，例如伦敦沙门氏菌（*S. london*）、迈阿密沙门氏菌（*S. miami*）、利齐蒙德沙门氏菌（*S. richmond*）等，血清型放在种名之后。在采用这个系统之前，菌种和亚种的命名方式是很多的——例如鼠伤寒沙门氏菌是根据它是老鼠伤寒热的病原菌而命名的。

23.1.2 沙门氏菌的分布

沙门氏菌主要分布在动物的肠道中，例如鸟类、爬虫类、牲畜、人类和昆虫类肠道中。虽然它们主要栖息在肠道中，但有时在身体的其它部位也能发现它们。作为肠道菌群，它们会随着粪便排泄出来，再由昆虫和其它动物传播到其它地方。它们也可以在水中存在，尤其是污染的水中。但污染的水和食品被人或其它动物通过昆虫或其它途径摄入时，这些微生物就再次经过肠道、粪便继续循环。这个循环可以借助于动物产品和饲料的国际贸易而扩大，这是沙门氏菌在世界范围分布和导致问题的主要原因。

虽然沙门氏菌可以反复从大量的不同动物中分离出来，但它们在动物体中不同部位的发生率是不同的。在一次对屠宰场的猪的研究中，Kampelmacher[29]发现这些微生物在肾脏、肝脏、胆汁、肠系膜和淋巴结的入口处、横膈膜和粪便中都存在。在淋巴结中的发生率比粪便中的发生率高。沙门氏菌在敏感动物群中频繁出现的部分原因是不含沙门氏菌的健康动物被同群中的带菌动物感染。带菌者是指反复沾染沙门氏菌（一般通过粪便）而不具有任何患病症状的人或动物。在检验宰杀的家禽中，Sadler 和 Corstvet[55]发现肠道的带菌比例为 3%～5%。在宰杀中或刚宰杀后，也可能出现来自粪便的污染。

23.1.2.1 动物饲料

1989 年沙门氏菌在工业生产的动物饲料中的发生率约为 49%。在美国农业部检查的包装饲料和熟饲料中，其发生率在 20%～25%范围内，而颗粒饲料中只有 6%[19]。在对种马和壮年马的研究中，发现它们的肉和骨中 60%含有沙门氏菌，饲料被认为是种马中沙门氏菌的最终来源[27]。在 1969—1989 年间，美国烤肉生产中的沙门氏菌污染问题几乎没有什么改变[27]。熟饲料中沙门氏菌的污染最有可能的是二次污染。在动物饲料中发现的主要血清型是森夫顿堡沙门氏菌（*S. senftenberg*）、蒙德维的亚沙门氏菌（*S. montevideo*）和塞罗沙门氏菌（*S. cerro*）。在熟饲料或成品饲料中未发现肠炎沙门氏菌（*S. enteritidis*）。

在对宰杀后健康牛血清含量的检验中，45%被发现含有沙门氏菌[20]。将牛运送到屠宰场的环境中，约 57%的样品呈现这些微生物阳性。

23.1.2.2 食品产品

在来源于工厂生产和包装的 247 份食品被检样品中，有 17 份呈现沙门氏菌阳性[1]。被污染的食品包括各种糕饼、饼干面团、面卷和玉米面包。这些微生物也发现存在于椰子粉、沙拉调料、蛋黄酱、乳品和许多其它食品中。在对健康食品的研究中，工厂产品中均未见沙门氏菌，但是从同一厂商生产的 3 份牛肝粉中，有 2 份被分离出了明尼苏达沙门氏菌（*S. minnesota*）、鸭沙门氏菌和德拜沙门氏菌（*S. derby*）[66]。

在 1969 年对 40 家香肠生产厂的研究中，566 份被检样品中沙门氏菌总的发生率为 28.6%[26]。10 年之后，被检的 603 份样品中总的发生率下降到了 12.4%。在这 40 家被

检的工厂中，发生率下降的有 40 家，上升的有 13 家，维持不变的有 7 家。在对 69 包生鸡肉块的沙门氏菌发生率的调查中，34.8%呈阳性，其中有 11 种血清型，而出现最普遍的是慕尼黑沙门氏菌 (*S. muenchen*)[54]。在对委内瑞拉 45 份鸡块样品的研究中，有 41 份检出了沙门氏菌，包括 11 种血清型，其中鸭沙门氏菌出现最多[52]。

对人类来说，鸡蛋、家禽、肉类和肉制品是传播沙门氏菌的最常见的食物载体。在 1963—1965 年期间对 61 起发生在人群中的沙门氏菌病的研究中，鸡蛋和蛋制品起因的占 23 起，雏鸡和火鸡的 16 起，牛和猪肉的 8 起，冰淇淋的 3 起，土豆沙拉的 2 起，其它各种食品的 9 起[68]。1967 年，涉及 12 836 份沙门氏菌病例的来自 37 个国家的最常见的沙门氏菌食品载体有牛肉、火鸡、蛋和蛋制品及乳品。1966 年在美国疾病控制中心研究的 7907 份沙门氏菌分离物中，有 70%来自生的和未加工的食品，其中来源于火鸡和雏鸡的占了 42%。美国 1968—1994 年间分离出的血清型如图 23.1 所示。

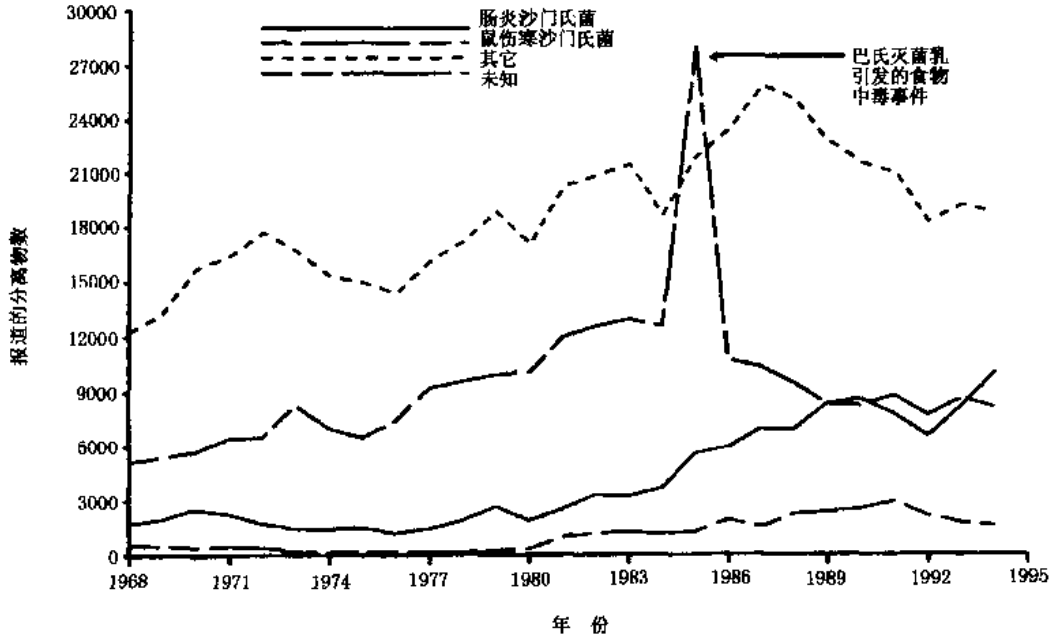


图 23.1　美国 1968—1994 年间分离的沙门氏菌的血清型[53]

注：摘自公众健康实验信息系统，报道者：CDC，Morb. Mort. Wkly. Rept. 45[53] (1995)。

烤鸡制品中约有 70%受到了沙门氏菌的污染。这些微生物似乎不是家禽中正常的群落，但是它们从环境中通过昆虫、啮齿动物、饲料、其它动物和人类受到污染[44]。在 418 份来源于 42 种牲畜卵巢的样品中，有 32 种牲畜的 111 (26.6%) 份样品呈沙门氏菌阳性[2]。在所发现的 15 种血清型中，最常出现的 5 种概括在表 23.2 中。

鼠伤寒沙门氏菌总是世界上出现于食品中的最常见血清型。一般来说可以认为，沙门氏菌各种血清型在食品中的发生率与它们在人体和动物中的发生率是平行的，但是实际情况并不总是这样 (表 23.2)。在 20 世纪 50 年代和 60 年代初期，肠炎沙门氏菌发生率异常高是出乎人们预料的，这一血清型还将在后面进一步讨论。

表 23.2　1956—1990 年间不同来源的 5 种最常见沙门氏菌的血清型

血清型	拉丁名称	人体（英国，1956—1960）	食品（美国，1963—1965）	食品（美国，1974—1985）	人体（美国，1967）	非人体（美国，1967）	人体（美国，1972）	人体（美国，1980）	牛肉香肠（美国，1979）	牛鸡肉（委内瑞拉，1983）	鸡肉、鸡块（葡萄牙，1986—1987）	来航鸡卵巢（美国，1989—1990）	烤肉制品/加工系统（美国，1989）
阿德莱德沙门氏菌	*S. adelaide*												30
阿哥拉沙门氏菌	*S. agona*								3		2	2	
鸭沙门氏菌	*S. anatum*			3	3				2	1			1
布隆方丹沙门氏菌	*S. bloemfontein*								2				
德比沙门氏菌	*S. derby*			4	4			1		5			
肠炎沙门氏菌	*S. enteritidis*	3			3		3			1			
哈达尔沙门氏菌	*S. hadar*												5*
哈尔姆斯塔德沙门氏菌	*S. halmstad*									4			
哈瓦那沙门氏菌	*S. havana*									5			
海德尔堡沙门氏菌	*S. heidelberg*	2	5		2	2	5	2				1	2
印地安那沙门氏菌	*S. indiana*												5*
婴儿沙门氏菌	*S. infantis*		1	5	5	5	4	5	1				

肯塔基沙门氏菌	*S. kentucky*				2													5[a]	
姆班达卡沙门氏菌	*S. mbandaka*																	1	
麦因饮沙门氏菌	*S. meunchen*											5[a]							
蒙德维的亚沙门氏菌	*S. montevideo*			4														5[a]	
新港沙门氏菌	*S. newport*	4						2		1					3[a]				
奥兰宁堡沙门氏菌	*S. oranienberg*			2														3	
圣保罗沙门氏菌	*S. saint paul*														3[a]				
施瓦普格降德沙门氏菌	*S. schwarzengrund*												3						
森大顿堡沙门氏菌	*S. senftenberg*				3														
鼠伤寒沙门氏菌	*S. typhimurium*	1		3		1		1		1		5[a]						1	
田纳西沙门氏菌	*S. tennessee*				1														
汤普森沙门氏菌	*S. thompson*	5																	
沃信顿沙门氏菌	*S. worthington*				4														

注：[a] Tie.

23.1.3 沙门氏菌生长与死亡

这些微生物是典型的其它革兰氏阴性菌，因为它们能够生长在很多种培养基中，在大约 37℃下 24h 内可以生长出可见的菌落。它们一般不能发酵乳糖、蔗糖或水杨苷，但是葡萄糖和某些其它单糖可以被它们发酵，发酵过程中有气体生成。虽然它们在正常情况下可以利用氨基酸作为氮源，但鼠伤寒沙门氏菌也可以利用硝酸盐、亚硝酸盐和 NH_3 作为惟一氮源[48]。虽然这些微生物一般不能利用乳糖发酵，但有些血清型能够利用这种糖。

沙门氏菌的最佳生长 pH 在中性附近，在 pH9.0 以上和 pH4.0 以下会致死。有些沙门氏菌的最低生长 pH 据记载为 4.05（用盐酸和柠檬酸调节），但是根据调节 pH 所用的酸不同，这种最低生长 pH 可以高达 5.5[19]。调节用酸对于最低生长 pH 的影响可以参阅表 23.3。据发现，在较低的 pH 下，通气有利于沙门氏菌的生长。如同其它多数细菌一样，pH、A_w、营养物含量和温度等参数都能影响沙门氏菌的生长[86]。为了最好地生长，沙门氏菌需要的 pH 在 6.6～8.2。在这一范围内，最低生长温度据报道为海德尔堡沙门氏菌 5.3℃，鼠伤寒沙门氏菌 6.2℃[42]。很多研究者报道沙门氏菌生长的上限温度为 45℃。在生长的水分活度方面，据报道在中性 pH 环境下，当 A_w 值低于 0.94 时，沙门氏菌的生长受到了抑制，当 pH 下降至生长极限值时，所需的 A_w 值较高。

表 23.3　在最佳实验室条件下沙门氏菌开始生长的最低 pH[19]

调节用酸	pH	调节用酸	pH	调节用酸	pH
盐酸	4.05	苹果酸	4.30	庚二酸	5.10
柠檬酸	4.05	乳酸	4.40	醋酸	5.10
酒石酸	4.10	琥珀酸	4.60	丙酸	5.50
葡萄糖酸	4.20	戊二酸	4.70		
富马酸	4.30	己二酸	5.10		

注：(1) 胰蛋白胨-酵母膏 葡萄糖培养基，鸭沙门氏菌、旧纳西沙门氏菌或森夫顿堡沙门氏菌接种量 10^4/mL。

(2) 摘自：Chung and Goepfert[16]；copyright ©1970 by institute of Food Technologists。

与葡萄球菌不同的是，沙门氏菌不能耐受较高的盐浓度。据报道盐浓度在 9% 以上会致死沙门氏菌。亚硝酸盐也是有效的抑制剂，在较低的 pH 下其抑制效果最大。这表明亚硝酸盐的抑制作用与它的未解离的 HNO_2 分子有关。Lerche[38]研究了沙门氏菌在蛋黄酱中的存活情况，他发现如果这种产品中的 pH 降到 4.0 以下可以使一些沙门氏菌致死。据发现，如果沙门氏菌的污染水平较高，则需要数天才能将它们致死，但是 24h 内可以使其细胞数减少。汤普森沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌比森夫顿堡沙门氏菌更能耐受酸的作用。

在加热致死方面，所有的沙门氏菌在乳品巴氏灭菌中都易致死。致死森夫顿堡沙门氏菌 775W 的 D 值已经在第五部分 16 中介绍过。Shrimpton 等人[59]报道，在全蛋液中 54.4℃下需要 2.5min 才能降低森夫顿堡沙门氏菌 775W 细胞数 10^4～10^5。这种血清型是所有沙门氏菌中最耐热的一种。采用这种方法处理全蛋液之后获得了不含沙门氏菌的产品，并且杀灭了蛋液中的 α-淀粉酶（参阅第五部分 16 中蛋白的热巴氏灭菌一节）。有人提议[7]，α-淀粉酶试验可以作为测定蛋液的热巴氏灭菌是否有效的方法（参照乳品巴氏灭

菌中以磷酸酯酶作为检验的方法)。在对森夫顿堡沙门氏菌 775W 耐热性的研究中,Ng 等人[47]发现,这一菌株在指数生长期比在生长的平衡期对热更为敏感。这些研究者还发现生长在 44℃下的细胞比生长在 15℃或 35℃下的细胞更为耐热。

Beloian 和 Schlosser[5]研究了焙烤食品中沙门氏菌的致死情况,他们发现焙烤食品在最慢的加热区域温度达到 71.1℃或更高时,可以认为沙门氏菌已经完全被杀死。它们采用的是森夫顿堡沙门氏菌 775W 菌株,细胞浓度为 7000～10 000/mL,试验介质是溶解的蛋粉。要在家禽体内杀死此菌株,所推荐的内部温度至少要达到 71.1℃[46]。虽然有报道称森夫顿堡沙门氏菌 775W 菌株比鼠伤寒沙门氏菌的耐热能力强 30 倍[17],但是在干热条件下后者比前者的耐热力强[18]。这些研究者还进行沙门氏菌在牛乳巧克力中对干热的耐热性的实验。

Rogers 和 Gunderson[53]调查了蒙德维的亚沙门氏菌在火鸡中的致死情况,他们发现在 4.5～5kg 火鸡中,当初始含菌数为 1.15×10^8 时,需要 4h 55min 才能杀死这种菌,这时的内部温度达到了 71.1℃,对于初始菌数在 3.2×10^5 的 8.2kg 火鸡,杀死这种菌需要 6h 20min。沙门氏菌对电离辐射相当敏感,在多数食品和饲料中,5～7.5kGy 的剂量可以有效地杀死它们。对于某些在冷冻蛋中的沙门氏菌,降低一个对数单位需要的剂量据报道为0.4～0.7kGy。Ley 等人[39]研究了不同食品中沙门氏菌对辐射致死的敏感性。这些研究者发现在冷冻全蛋中,5kGy 的照射剂量使得鼠伤寒沙门氏菌数量减少了 10^6,而对于冷冻马肉 6.5kGy 的剂量对于减少 10^5 的菌数是必需的,减少骨粉中 10^7～10^8 的细菌数需要 5～7.5kGy 的剂量,而在椰子干粉中降低 10^6 鼠伤寒沙门氏菌仅需要 4.5kGy 的照射剂量。

在干燥食品中,当蒙德维的亚沙门氏菌被接种到乳粉、可可粉、家禽饲料、肉粉和骨粉中时,它比海德尔堡沙门氏菌的耐热性更强[28]。在水分活度 A_w0.43 和 0.52 条件下加热时,这些菌的存活率要比在 A_w0.75 下加热时的存活力高。

23.1.4 沙门氏菌食物中毒综合征

这种病症是由于摄入了含有大量沙门氏菌属的非寄主专一性菌种或血清型的食品所引起的。在摄入含毒食品之后,症状一般在 12～14h 内出现,但是较短或较长的潜伏时间也有报道。这种病的症状包括恶心、呕吐、腹痛(不如葡萄球菌食物中毒严重)、头痛、畏寒和腹泻。这些症状一般还伴有乏力、肌肉酸痛、视觉模糊、中等程度发热、躁动不安和嗜睡。这些症状一般延续 2～3d。它的平均致死率为 4.1%。不同年龄段的致死率有所不同,1 岁之内的致死率为 5.8%,1～15 岁的致死率为 2%,50 岁以上的致死率为 15%。在不同的沙门氏菌菌种中,据报道猪霍乱沙门氏菌的致死率最高为 21%。

虽然这些微生物一般会从肠道中迅速消失,但有 5%的患者在康复后可能成为这种菌的带菌者。

导致沙门氏菌病的食品中细菌数一般需要 10^7～10^9/g。据报道,有时导致发病的细菌数也较少[12]。在 3 起发病事件中,导致发病的细菌数只有 100/100g(巧克力中的伊斯特伯恩沙门氏菌)至 15 000/g(一种红染色液中的古巴沙门氏菌)。一般来说,能导致胃肠炎的细菌数在 10^7/g 和 10^9/g(巴雷利沙门氏菌和新港沙门氏菌)至 10^9～10^{10}/g(鸡白痢沙门氏

菌)之间[8]。

23.1.5 沙门氏菌毒素及其性质

沙门氏菌病的发病诱因涉及到两种毒素——一种肠毒素和一种细胞毒素。肠毒素的存在最早是由 Koupal 和 Deibel 在 1975 年证实的[36]。采用肠炎沙门氏菌和乳鼠进行试验时，生成了一种与细胞壁结合的难以分离的毒素，这种在乳鼠中产生的毒素类似于大肠杆菌产生的耐热和不耐热的肠毒素。采用包括幼兔在内的动物进行循环试验时出现了不一致的结果。采用鼠伤寒沙门氏菌进行试验时，用兔回肠循环分析法可以检出沙门氏菌在脑心浸出汁和 2%酪蛋白氨基酸培养液中产生了肠毒素[58]。这两种培养基在所试验的几种培养基中是最好的。同时，另一组研究者从能诱导兔皮脉管通透因子的沙门氏菌中分离出一种毒素，这种毒素的作用方式类似于霍乱弧菌（*Vibrio cholerae*）和大肠杆菌产生的肠毒素[56]。上述毒素在兔回肠循环试验中出现了阳性反应。后来人们证实，脉管通透因子可以被专一性霍乱抗毒素抑制，上述毒素类似于霍乱弧菌毒素，能导致中国鼠卵巢细胞的伸长[57]。在试图获得大量沙门氏菌肠毒素的研究中，Koo 和 Peterson[32]研究了营养因子的影响，他们发现甘油、生物素和 Mn^{2+} 促进了毒素的产生，而葡萄糖是最差的碳源。后来的研究还证实，在 pH6～7 或更高、温度 37 C 和增加通气的情况下，细胞生长平衡期产生的肠毒素较多[34]。这种肠毒素在 100 C 下是不稳定的，它的相对分子质量在 110 000 以上，等电点约为 4.3～4.8[31]。接种后添加丝裂霉素增加了培养物滤液中的毒素含量，这是因为噬菌体的诱导和后来细胞的裂解作用所致。上述证据表明，沙门氏菌毒素是一种与大肠杆菌肠毒素作用方式类似的肠毒素，即它可以提高肠道中的环状腺苷单磷酸（cAMP）水平。与大肠杆菌肠毒素不同的是，它的生成量要低得多，而且难以从产毒细胞中分离出来。另外，沙门氏菌肠毒素与霍乱毒素在生物学性质和抗原性质上也很类似，通过非胃肠道注入加热后的霍乱毒素（类霍乱毒素原）之后，防止了沙门氏菌活细胞对循环液的响应[16]。

虽然上述肠毒素呈现出了影响腺苷酸环化酶系统的性质，并能诱导试验动物中的液体积累，但还是不能解释肠道毒素与沙门氏菌病的关系。虽然大肠杆菌肠毒素能诱导液体的积累，但与志贺氏菌病和沙门氏菌病正常相关的组织毒素并不会出现。换句话说，沙门氏菌病的发病机理与志贺氏菌病的发病机理更为类似，而与肠毒素导致的综合征不太类似。这种情况导致了 Koo 等人[35]对沙门氏菌提取物中的细胞毒素进行了研究。某些欧洲研究者实际上早在 1962 年就对沙门氏菌浸出物中细胞毒素的活性进行过描述。当将沙门氏菌细胞的提取物注入分离的兔肠道皮膜细胞和卵巢细胞之后，蛋白质的合成受到了抑制[34,35]。这些研究者提供的证据支持了下述观点，即在沙门氏菌病发病过程中，肠道黏膜上出现的细胞损伤是由细胞毒素引起的。一旦受到损伤之后，肠道黏膜更易于受微生物的感染，这些感染的微生物又能导致其它组织的损伤。虽然志贺氏菌病的发病机理似乎与沙门氏菌病更密切相关，但前者比后者能导致更多的组织损伤。这种情况可能起因于（破坏力更大的）另外一种毒素或其它因素。有人发现，当使用一种镇静剂（吲哚美辛）时，沙门氏菌肠毒素和霍乱毒素都能诱导前列腺素在肠道皮膜细胞中的合成，这表明在中毒过程中前列腺素也可能起着一定的作用[13]。

沙门氏菌与耶尔森菌、志贺氏菌和某些大肠杆菌菌株可以侵入真核细胞，并在其中繁殖。沙门氏菌被细胞吸收似乎与微菌丝有关，因为细胞松弛素（能抑制微菌丝的形成）降低了沙门氏菌侵入细胞的活性[16]。有可能是微菌丝诱导了沙门氏菌蛋白质的合成，而这种蛋白质是沙门氏菌被寄主细胞吸附和吸收所必需的。有证据表明几种新的蛋白质是猪霍乱沙门氏菌和鼠伤寒沙门氏菌黏附和入侵细胞所必需的[15]。缺少这些蛋白质合成能力的突变株对于老鼠是无毒的。沙门氏菌细胞膜上的某些细胞通透性蛋白（外膜蛋白）与某些其它膜蛋白是已知能导致发病的蛋白质[17]。

当沙门氏菌细胞与肠道皮膜细胞的端点相互作用时，分泌出中性多形核（PMN）激活因子和白细胞介素-8（IL-8），它似乎在后来的 PMN 输入过程中起作用。获得透过细胞膜的信号后即通过扩散方式进入。PMN 在与肠道皮膜细胞接触之后进入皮膜细胞是沙门氏菌毒性的一种作用机制[42]。含毒菌株可以发出穿过皮膜细胞的信号，而非产毒菌株不能发出这种信号。霍乱毒素和沙门氏菌在胃肠道中的感染诱导了不同细胞激活素的生成。采用老鼠循环阻断分析法的试验证明，霍乱毒素可以诱导循环液中 IL-6 和 IL-10 的分泌，而鼠伤寒沙门氏菌诱导 IL-Q、IL-6、肿瘤坏死因子 α-和 γ-干扰素的分泌[31]。

沙门氏菌抗原被巨噬细胞吞噬后，抗原被分解成多肽，这些多肽分子结合到主要组织兼容复合体-Ⅱ（MHC-Ⅱ）分子上，后者分布在细胞的表面起着被识别的作用。这种 MHC-Ⅱ分子激活了 $CD4^+$淋巴细胞（T-协助细胞），使其分泌淋巴激活素，这种激活素能起动细胞的免疫反应，并能协助 B-细胞产生特定的抗体。

鼠伤寒沙门氏菌能在巨噬细胞中存活，它在巨噬细胞中占据了液泡的空腔。热致死的细胞能够导致抗体响应，但是这并不能产生有效的保护作用来抵抗鼠伤寒沙门氏菌活细胞后来的侵袭。

23.1.6 发生率与含毒食品

沙门氏菌食物中毒在美国的准确发生率目前还不清楚，因为小型中毒事件一般不会被报告至公众健康当局。美国疾病控制中心的研究者指出，每年美国的发病人数在 40 000 人以上，其中死亡的约有 500 人[71]。根据某些推测，美国 1988 年的发病人数在 84 万至 400 万人[54]。如同葡萄球菌胃肠炎一样，最大的沙门氏菌病发病事件发生在饭店或类似的公众场合。

但是，有两起最大的沙门氏菌病事件发生在相当异常的环境下。其中最大的一起发生在 1994 年，所涉及的人数在 200 000 人以上。其载毒食品是乳制冰淇淋，这种原料乳是在原先装载过蛋液的罐车中运输的。所涉及的血清型是肠炎沙门氏菌，所涉及的患者至少遍及美国的 41 个州。另一起最大的事件发生在 1985 年，涉及的患者接近 200 000 人[54]。这起事件的载毒食品是伊利诺斯州一家乳品厂生产的 2%牛乳，鼠伤寒沙门氏菌是所涉及的病原菌（见图 23.1 和图 23.2）。1974 年最大的发病事件发生在那瓦约印第安度假村，当时有 3400 人中毒发病[23]。这次事件的载毒食品是土豆沙拉，当时约有 11 000 人在烧烤野餐中食用了这种沙拉。这种沙拉当时是在不当的温度下储存了 16h 后供给人食用的，所分离出的血清型是新港沙门氏菌。

自从 20 世纪 70 年代以来，肠炎沙门氏菌就是美国东北部和欧洲部分地区一系列食

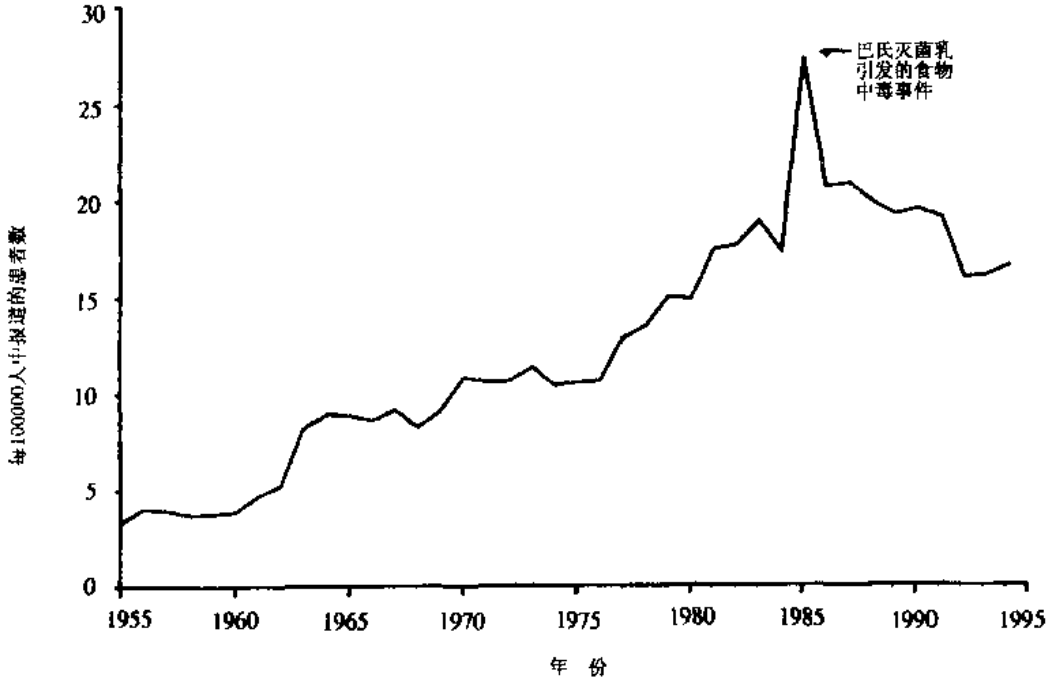


图 23.2 美国 1955—1994 年间发生的沙门氏菌病（不包括伤寒热）

注：摘自美国疾病预防控制中心 1995。Morb. Mort. Wkly. Rept. 45[53]。

物中毒事件的病原菌。美国在 1985—1989 年间的发病事件，以及发病人数和死亡情况概括在表 23.4 中。在 1985 年 1 月至 1987 年 5 月期间，美国东北部发生了 65 起食物中毒事件，涉及发病人数为 2119 人，其中死亡 11 人[52]。这些发病事件有 77%是由 A 级带壳蛋或其它含蛋食品引起的。在 1973—1984 年间，整个美国有 44%的肠炎沙门氏菌的中毒事件与含蛋食品有关[62]。在 20 世纪 70 年代，肠炎沙门氏菌占了所有美国分离出的沙门氏菌的 5%，但是在 1989 年，这种菌占了 20%[64]。1987 年，鼠伤寒沙门氏菌占了所有沙门氏菌分离物的第二位，达到 16%。它是 1988 年在西班牙鸡蛋中发现的最普遍的血清型[49]，也是英国和威尔士沙门氏菌病食物中毒的主要病原菌，在这两个地区中它们也被发现存在于禽肉和禽蛋中[21]。与美国中毒事件不同的是，欧洲的中毒事件是由噬菌体 4 型菌株引起的，这种菌株比噬菌体 7、8 或 13a 型对幼龄鸡的入侵能力更强[21]。

表 23.4 美国 1985 年 1 月至 1989 年 10 月肠炎沙门氏菌中毒事件

年 份	事件数	患病人数	死亡数
1985	19	168	1
1986	34	1 042	6
1987	50	2 370	15
1988	37	956	8
1989	19	1 628	13

注：摘自 Morb. Mort. Wkly. Rep. 38: 877—880 (1990)。

为什么肠炎沙门氏菌中毒事件的增多与家禽或禽蛋产品有关，目前还不清楚。有些研究者发现这些微生物存在于鸡蛋和蛋鸡的卵巢中[49]，但是另一些研究者在完好的蛋中未能发现。在主要来源于美国东南部的 42 只蛋鸡中，只有 1 只鸡的卵巢中分离出了这种菌[2]。肠炎沙门氏菌中毒事件在 7 月和 8 月的发生率比其它月份高，这表明这段时间肠炎沙门氏菌在蛋中或蛋上，或其它家禽产品中的生长较快。上述菌株是不耐热的，许多中毒事件是由于食用了生的或未煮透的鸡蛋引起的。在一份研究中，当肠炎沙门氏菌接种到正常鸡蛋的蛋黄中后，在 7℃温度下 94d 未出现生长[6]。在 37℃下，肠炎沙门氏菌在正常鸡蛋黄中的生长要比血清阳性鸡所产蛋的蛋黄中的生长要快。肠炎沙门氏菌进入禽蛋的可能途径如下[46]：

①通过卵巢；

②从腹膜转移到蛋黄囊或输卵管；

③蛋经过泄殖腔时被细菌穿过蛋壳；

④蛋的洗涤过程；

⑤食品加工过程。

在 1983—1987 年，美国发生的沙门氏菌食物中毒事件、患病人数和死亡人数列在表 23.5 中。在 1973—1987 年，美国沙门氏菌食物中毒事件所涉及的 10 种主要食品列在表 23.6 中。其中主要的载毒食品是牛肉、火鸡、雏鸡、冰淇淋和猪肉制品。在 1955—1994 年间，美国所报道的沙门氏菌病患病人数如图 23.2 所示。

表 23.5　　1983—1987 年间美国沙门氏菌食物中毒事件[4]

年　份	事件数	患病人数	死亡数
1983	72	2 427	7
1984	78	4 479	3
1985	79	19 660	20
1986	61	2 833	7
1987	52	1 846	2

表 23.6　1973—1987 年间美国沙门氏菌食物中毒事件所涉及的 10 种主要食品[4]

位　次	食　品	引发的中毒事件数	所占比例/%
1	牛肉	77	9.7
2	火鸡	36	4.5
3	雏鸡	30	3.8
4	冰淇淋	28	3.5
5	猪肉	25	3.2
6	乳制品	22	2.8
7	蛋类	16	2.0
8	焙烤制品	12	1.5
9	墨西哥食品	10	1.3
10	水果和蔬菜	9	1.1

注：一起事件定义为至少涉及两例或两例以上患者。

23.1.7 沙门氏菌病的预防与控制

人和其它动物的肠道是沙门氏菌的主要栖息场所。动物粪便对于人体的感染尤其值得重视，动物的外皮可能被它们的粪便所污染。沙门氏菌通过无症状的动物感染和粪便传播在动物群体中得以生存。这两种方式都能导致屠宰动物被感染。

二次污染是沙门氏菌感染人类的第二个重要的途径。这些菌存在于肉类、蛋类，甚至在空气中，它们在加工过程中通过未污染食品与污染食品的直接接触，会不可避免地出现在某些食品中[28]。

由于沙门氏菌在世界范围内广泛分布，只有在动物和人类都不带有这种菌时才有可能最终控制沙门氏菌病的食物中毒事件。这显然是一个艰巨的任务，但也不是不可能的，在 2 300 多种血清型中，只有 35 种血清型占了人体分离物的 90%，占了非人体分离物的 80%[41]。

从消费者的角度看，沙门氏菌带菌者也起了一定的作用，但是这类作用的重要性究竟有多大还难以定论。在家庭和饮食服务场所的食品加工和处理不当仍然是沙门氏菌食物中毒发生的主要原因。

在肠炎沙门氏菌对鸡的感染方面，有一份研究采用了噬菌体 8 型菌株，以 10^8 的剂量通过口服饲喂给成年蛋鸡[30]。2d 之后据发现这种菌已经布满整个鸡体内，包括卵巢和输卵管。这种菌在所产的蛋中也被检测到，虽然它在新下的蛋中含量很低。这些研究者认为，鸡蛋在感染后的卵巢组织中遭受了递减感染，而在产道和泄殖腔中遭受了递增感染，并且在上输卵管组织中遭受了横向感染[30]。

23.1.8 家禽中的竞争排斥作用

现在人们普遍认为家禽制品中的沙门氏菌的主要来源是通过肠道，包括盲肠。如果幼龄鸡感染了沙门氏菌后，这种菌会进入粪便中，通过粪便感染其它家禽。竞争排斥是减少或消除肠道带菌禽的方法之一。

在自然条件下，当禽蛋孵化时有沙门氏菌存在，幼龄禽的胃肠道中会发育成除了一系列不致病的、包括这些菌和弯曲菌在内的微生物群。一旦病原菌驻留下来之后，它们就会在禽鸟的整个生命过程中维持在体内和进入排泄物中。竞争排斥是这样一种现象，当人为地将不含沙门氏菌的禽粪、或混合粪便细菌培养物，饲喂给幼龄鸡时，其中无害微生物会占据沙门氏菌可能占据的同样肠道内位点，这样就排斥了沙门氏菌或其它肠道病原菌可能的后来入侵。这种观点在 20 世纪 70 年代得到了发展和研究，据多位研究者发现对于排斥沙门氏菌有效。

不含肠道病原菌的生物群可以通过饮水饲喂给才孵化出来的小鸡，或在孵化箱内喷洒接种。保护作用可以在几小时内建立，一般会在整个生命过程中存在于家禽体内，或存在到这些菌群被干扰为止。老龄家禽可以先饲喂抗菌素杀死肠道病原菌后，再饲喂竞争排斥菌群。只有活菌细胞起有效作用，耗氧和厌氧肠道菌群似乎都是必需的。嗉囊和盲肠似乎是主要的驻留位点，其中在无菌鸡体内盲肠中驻留较多。在一项研究中发现，经过连续 4 次清洗后，这种保护性菌群仍然附着在盲肠壁上[61]。对于 1d 龄的雏鸡，部分保

护可以在处理之后 0.5～1.0h 内实现，但是完全保护需要 6～8h[59]。在回顾对家禽中沙门氏菌竞争排斥作用的微生物学时发现，采用未知菌群比已知菌群所提供的保护作用好，尤其是在实验室条件下[60]。

数个欧洲国家在现场进行了竞争排斥处理试验，有关防止或减少沙门氏菌进入壮龄和成年蛋禽的试验都获得了成功[45]。在鸡经过盲肠培养物预处理后，再饲喂一种沙门氏菌，后者在盲肠中内未见繁殖，而未处理的对照鸡盲肠中，存留的沙门氏菌达 10^{9}/g 以上[25]。

竞争排斥作用的要点是沙门氏菌与肠道已有的菌群竞争肠壁上同一驻留位点。细菌附着因子的详细性质目前还不完全清楚，但是菌毛或鞭毛可能是起作用的结构。但是在沙门氏菌对家禽表皮的附着行为上，上述细胞结构似乎并不是关键[40]。细菌附着时可能涉及到细胞外多糖的一种糖萼性质，如果这样，用这种物质对幼龄鸡进行处理可能与使用活的培养物一样有效。虽然竞争排斥处理方法似乎对大型孵化场是可行的，但是对于小型生产者似乎可行性较差。

23.2　志贺氏菌病

志贺氏菌属（*Shigella*）属于肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*），沙门氏菌科（*salmonellae*）和埃希氏菌科（*escherichiae*）也属于这一科。志贺氏菌属只有 4 个菌种：痢疾志贺氏菌（*S. dysenteriae*）、弗氏志贺氏菌（*S. flexneri*）、鲍氏志贺氏菌（*S. boydii*）和宋内志贺氏菌（*S. sonnei*）。痢疾志贺氏菌是导致典型性细菌型痢疾的病原菌，在敏感人体中只要 10 个细胞就可以导致发病。虽然这种病症可以起因于食物，但它们并不像其它 3 种志贺氏菌一样被认为是导致食物中毒的病原微生物，因此这里不再讨论它与食品的关系。不同的是，志贺氏菌并不在非人类动物中存在。这 3 种菌的许多差别概括在表 23.7 中。志贺氏菌与埃希氏菌在种系遗传上比沙门氏菌更为接近。

表 23.7　　志贺氏菌、沙门氏菌和埃希氏菌的比较

菌　属	拉丁名称	葡萄糖	运动性	H_2S	吲哚	柠檬酸	(G+C)%
沙门氏菌属	*Salmonella*	AG	+[a]	−	−[b]	−	48～52
志贺氏菌属	*Shigella*	AG	+[a]	−	−	−	50～53
埃希氏菌属	*Escherichia*	A	+	−	+	−	49～53

[a] 为一般情况下；[b] 为 1 型菌株。

在志贺氏菌属中，能导致食物中毒胃肠炎的 3 种病原菌根据它们的 O 抗原性质被分成 3 个血清组：弗氏志贺氏菌在 B 组，鲍氏志贺氏菌在 C 组，宋内志贺氏菌在 D 组。它们是不运动的、氧化酶阴性、只能由糖产酸、在柠檬酸作为惟一碳源时不生长、在 KCN 琼脂上不生长、不产生 H_2S 的杆菌。一般来说，它们在普通培养基上的生长没有埃希氏菌旺盛。1984 年在美国人体中分离的志贺氏菌中，64% 是宋内志贺氏菌，31% 是弗氏志贺氏菌，3.2% 是鲍氏志贺氏菌，1.5% 是痢疾志贺氏菌[9]。

志贺氏菌需要的生长环境与多数其它肠道菌是类似的，据报道最低生长温度至少要10℃，最高生长温度为48℃。在一项研究中，弗氏志贺氏菌在脑心浸出液中于10℃下未见生长[68]。宋内志贺氏菌似乎比其它3种菌更能适应较低的温度。有资料记载它们可以在pH5.0下生长，最适生长pH为6～8。弗氏志贺氏菌在pH5.0、19℃的脑心浸出液中未出现生长[68]。这种菌在温度和pH下降或NaCl含量上升时，被亚硝酸盐抑制[67]。它们是否能在一些环境参数低于沙门氏菌或埃希氏菌生长的条件下生长还不清楚。它们的耐热性似乎与大肠杆菌菌株是类似的。

23.2.1 志贺氏菌病事件

1983—1987年间美国志贺氏菌病的发生情况概括在表23.8中。1973—1987年间，志贺氏菌食物中毒占了所报道已鉴定出病原菌的食物中毒事件的12%，这些事件仅次于葡萄球菌食物中毒（14%）和沙门氏菌食物中毒（45%）而位于第三位[54]。个人卫生不良是志贺氏菌食物中毒的主要原因，贝类、水果、蔬菜、鸡肉和沙拉是主要的载毒食品。这些食品的污染是通过粪便—口人途径传播的。志贺氏菌不像沙门氏菌和埃希氏菌一样能在环境中长期存在。美国在1968—1994年间所报道的志贺氏菌分离菌种概括在图23.3中。这些分离物包括所有来源的菌种，其中宋内志贺氏菌是所报道的儿童托管中心发现最多的菌种。美国在1965—1994年间所报道的志贺氏菌病如图23.4所示。

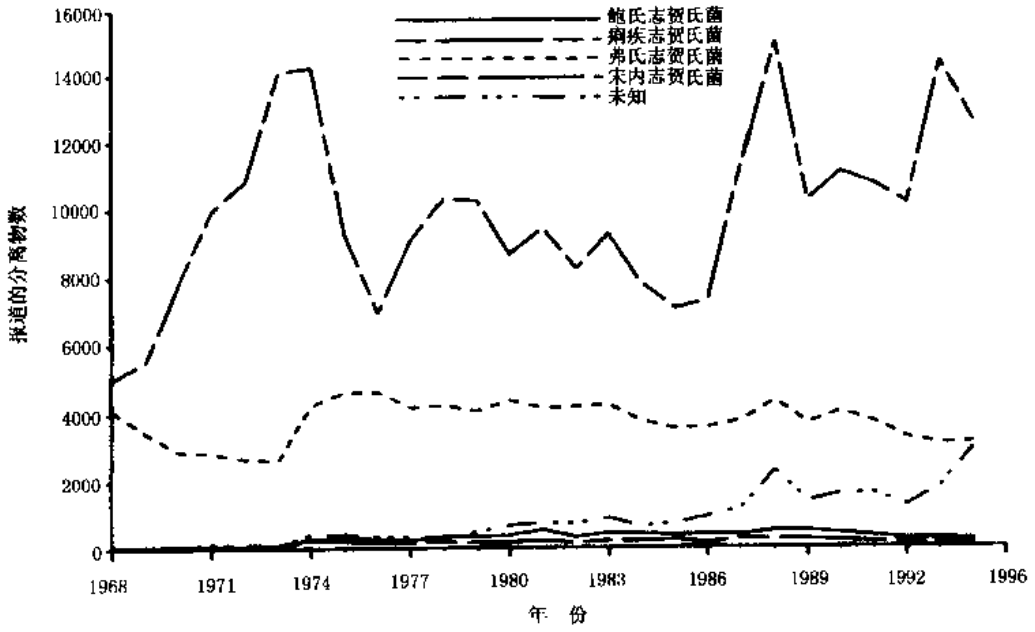


图23.3 美国1968—1995年间分离的志贺氏菌菌种

注：数据来源：公众健康实验室信息系统，报道者：*CDC*，Morb. Mort. Wkly.[161]（1995）。

23.2.2 毒性性质

虽然人们对痢疾志贺氏菌的毒性性质了解的比较多，但是对于其它3种致病菌的毒



图 23.4　美国 1965—1994 年间志贺氏菌病发病情况[6,57]

注：摘自美国疾病预防控制中心 1995，Morb. Mort. Wkly[6,5]。

性机制了解得很少。弗氏志贺氏菌的致病性质类似于大肠杆菌肠道侵入菌株。弗氏志贺氏菌比宋内志贺氏菌和鲍氏志贺氏菌的入侵能力强。弗氏志贺氏菌缺少志贺氏菌毒素，但是它在大型质粒上具有 4 种与毒性有关的位点——其中 3 个位点是细胞附着和侵入所必需的，另一个用于在寄主细胞内存活和繁殖。志贺氏菌的 4 种菌都能入侵结肠黏膜，并在其中繁殖，从而导致黏膜的急性渗透性变化[6]。本质上说，它们是细胞内空泡中的驻留菌，它们逃出细胞需要一种 220kb 的质粒，尤其是弗氏志贺氏菌。这种质粒负责被感染细胞中蛋白质合成的抑制。一种很有效的受体—再循环抑制剂（氯喹）能抑制沙门氏菌和耶尔森氏菌的入侵，但是不能抑制弗氏志贺氏菌的入侵。另外，微菌丝抑制剂（细胞松弛素）能够削弱弗氏志贺氏菌的入侵能力，这表明这种菌的入侵需要微菌丝的作用。与刚果红的结合能力可能与毒性作用有关，海拉细胞也用于某些入侵机理的研究中。

表 23.8　　美国 1983—1987 年间与食品有关的志贺氏菌病[4]

年　份	事件数	患者数	死亡数
1983	7	1993	0
1984	9	470	1
1985	6	241	0
1986	13	773	1
1987	9	6494	0

注：摘自 Bean and Griffin[4]。

参 考 文 献

[1] Adinarayanan, N., V. D. Foltz, and F. McKinley. 1965. Incidence of Salmonellae in prepared and packaged foods. *J. Infect. Dis.* 115: 19~26.

[2] Barnhart, H. M., D. W. Dreesen, R. Bastien, and O. C. Pancorbo. 1991. Prevalence of *Salmonella enteritidis* and other serovars in ovaries of layer hens at time of slaughter. *J. Food Protect.* 54: 488~491.

[3] Bean, N. H., and P. M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973~1987: Pathogens vehicles, and trends. *J. Food Protect.* 53: 804~817.

[4] Bean, N. H., P. M. Griffin, J. S. Goulding, and C. B. Ivey. 1990. Foodborne disease outbreaks, a 5-year summary, 1983~1987. *J. Food Protect.* 53: 711~728.

[5] Beloian, A., and G. C. Schlosser. 1963. Adequacy of cooking procedures for the destruction of salmonellae. *Amer. J. Pub. Hlth.* 53: 782~791.

[6] Bradshaw, J. G., D. B. Shah, E. Forney, and J. M. Madden. 1990. Growth of *Salmonellaenteritidis* in yolk of shell eggs from normal and seropositive hens. J. Food Protect. 53: 1033~1036.

[7] Brooks, J. 1962. Alpha amylase in whole eggs and its sensitivity to pasteurization temperatures. *J. Hyg.* 60: 145~151.

[8] Bryan, F. L. 1977. Diseases transmitted by foods contaminated by wastewater. *J. Food Protect.* 40: 45~56.

[9] Centers for Disease Control. 1985. Shigellosis--United States, 1984. *Mort. Morb. Wkly. Rept.* 34: 600.

[10] Chung, K. C., and J. M. Goepfert. 1970. Growth of *Salmonella* at low pH. *J. Food Sci.* 35: 326~328.

[11] Cohen, M. L., and R. V. Tauxe. 1986. Drug-resistant *Salmonella* in the United States: An epidemiologic perspective. *Science* 231: 964~969.

[12] D'Aoust, J. Y., and H. Pivnick. 1976. Small infectious doses of *Salmonella*. *Lancet* 1: 866.

[13] Duebbert, L. E., and J. W. Peterson. 1984. Enterotoxin-induced fluid accumulation during experimental salmonellosis and cholera: Requirement for prostaglandin synthesis by intestinal cells. *Bacteriol. Proc.*, 17.

[14] Duitschaever, C. L. 1977. Incidence of *Salmonella* in retailed raw cut-up chicken. *J. Food Protect.* 40: 191~192.

[15] Finlay, B. B., F. Heffron, and S. Falkow. 1989. Epithelial cell surfaces induce *Salmonella* proteins required for bacterial adherence and invasion. *Science* 243: 940~943.

[16] Finlay, B. B., and S. Falkow. 1988. A comparison of microbial invasion strategies of *Salmonella*, *Shigella* and *Yersinia* species. In *Bacteria-Host Cell Interaction*, ed. M. A. Horwitz, 227~243. New York: Alan R. Liss.

[17] Galdiero, F., M. A. Tufano, M. Caldiero, S. Masiello, and M. Di Rosa. 1990. Inflammatory effects of *Salmonella typhimurium* porins. *Infect. Immun.* 58: 3183~3186.

[18] Goepfert, J. M., and R. A. Biggie. 1968. Heat resistance of *Salmonella typhimurium* and *Salmonella senftenberg* 775W in milk chocolate. *Appl. Microbiol.* 16: 1939~1940.

19. Graber, G. 1991. Control of *Salmonella* in animal feeds. Division of Animal Feeds, Center for Veterinary Medicine. Food & Drug Administration. Report to the National Advisory Commission on Microbiological Criteria for Foods.

[20] Grau, F. H., and L. E. Brownlie. 1968. Effect of some pre slaughter treatments on the *Salmonella* population in the bovine rumen and feces. *J. Appl. Bacteriol.* 31: 157～163.

[21] Hinton, M., E. J. Threlfall, and B. Rowe. 1990. The invasive potential of *Salmonella enteritidis* phage types for young chickens. *Lett. Appl. Microbiol.* 10: 237～239.

[22] Hobbs, B. C. 1961. Public health significance of *Salmonella* carriers in livestock and birds. *J. Appl. Bacteriol.* 24: 340～352.

[23] Horwitz, M. A., R. A. Pollard, M. H. Merson, and S. M. Martin. 1977. A large outbreak of foodborne salmonellosis on the Navajo Nation Indian Reservation, epidemiology and secondary transmission. *Amer. J. Pub. Hlth.* 67: 1071～1076.

[24] Houston, C. W., C. W. Koo, and J. W. Peterson. 1981. Characterization of *Salmonella* toxin released by mitomycin C-treated cells. *Infect. Immun.* 32: 916～926.

[25] Impey, C. S., and G. C. Mead. 1989. Fate of salmonellas in the alimentary tract of chicks pretreated with a mature caecal microflora to increase colonization resistance. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 469～475.

[26] Johnston, R. W., S. S. Green, J. Chiu, M. Pratt, and J. Rivera. 1982. Incidence of *Salmonella* in fresh pork sausage in 1979 compared with 1969. *J. Food Sci.* 47: 1369～1371.

[27] Jones, F. T., R. C. Axtell, D. V. Rives, S. E. Scheideler, F. R. Tarver, Jr., R. L. Walker, and M. J. Wineland. 1991. A survey of *Salmonella* contamination in modern broiler production. *J. Food Protect.* 54: 502～507.

[28] Juven, B. J., N. A. Cox, J. S. Bailey, J. E. Thomson, O. W. Charles, and J. V. Shutze. 1984. Survival of *Salmonella* in dry food and feed. *J. Food Protect.* 47: 445～448.

[29] Kampelmacher, E. H. 1963. The role of salmonellae in foodborne diseases. In *Microbiological Quality of Foods*, ed. L. W. Slanetz et al., 84～101. New York: Academic Press.

[30] Keller, L. H., C. E. Benson, K. Krotec, and R. J. Eckroade. 1995. *Salmonella enteritidis* colonization of the reproductive tract and forming and freshly laid eggs of chickens. *Infect. Immun.* 63: 2443～2419.

[31] Klimpel, G. R., M. Asuncion, J. Haithcoat, and D. W. Niesel. 1995. Cholera toxin and *Salmonella typhimurium* induce different cytokine profiles in the gastrointestinal tract. *Infect. Immun.* 63: 1134～1137.

[32] Koo, F. C. W., and J. W. Peterson. 1981. The influence of nutritional factors on synthesis of *Salmonella* toxin. *J. Food Safety* 3: 215～232.

[33] Koo, F. C. W., and J. W. Peterson. 1983. Effects of cultural conditions on the synthesis of *Salmonella* toxin. *J. Food Safety* 5: 61～71.

[34] Koo, F. C. W., and J. W. Peterson. 1983. Cell-free extracts of *Salmonella* inhibit protein synthesis and cause cytotoxicity in eukaryotic cells. *Toxicon* 21: 309～320.

[35] Koo, F. C. W., J. W. Peterson, C. W. Houston, and N. C. Molina. 1984. Pathogenesis of experimental salmonellosis: Inhibition of protein synthesis by cytotoxin. *Infect. Immun.* 43: 93～100.

[36] Koupal, L. P., and R. H. Deibel. 1975. Assay, characterization, and localization of an enterotoxin

produced by *Salmonella*. *Infect. Immun.* 11: 14～22.

[37] Le Minor, L. and M. Y. Popoff. 1987. Designation of *Salmonella enterica* sp. nov., nom. rev., as the type and only species of the genus *Salmonella*. *Int. J. System. Bacteriol.* 37: 465～468.

[38] Lerche, M. 1961. Zur Lebenfahigkeit von Salmonellabakterien in Mayonnaise und Fleischsalat. *Wien. tierarztl. Mschr.* 6: 348～361.

[39] Ley, F. J., B. M. Freeman, and B. C. Hobbs. 1963. The use of gamma radiation for the elimination of salmonellae from various foods. *J. Hyg.* 61: 515～529.

[40] Lillard, H. S. 1986. Role of fimbriae and flagella in the attachment of *Salmonella typhimurium* to poultry skin. *J. Food Sci.* 51: 54～56, 65.

[41] Martin, W. J., and W. H. Ewing. 1969. Prevalence of serotypes of *Salmonella*. *Appl. Microbiol.* 17: 111～117.

[42] Matches, J. R., and J. Liston. 1968. Low temperature growth of *Salmonella*. *J. Food Sci.* 33: 641～645.

[43] McCormick, B. A., S. I. Miller, D. Carnes, and J. L. Madara. 1995. Transepithelial signaling to neutrophils by salmonellae: A novel virulence mechanism for gastroenteritis. *Infect. Immun.* 63: 2302～2309.

[44] Mead, G. C. 1982. Microbiology of poultry and game birds. In *Meat Microbiology*, ed. M. H. Brown, 67～101. London: Applied Science.

[45] Mead, G. C., and P. A. Barrow. 1990. *Salmonella* control in poultry by "competitive exclusion" or immunization. *Lett. Appl. Microbiol.* 10: 221～227.

[46] Milone, N. A., and J. A. Watson. 1970. Thermal inactivation of *Salmonella senftenberg* 775W in poultry meat. *Hlth. Lab. Sci.* 7: 199～225.

[47] Ng, H., H. G. Bayne, and J. A. Garibaldi. 1969. Heat resistance of *Salmonella*: The uniqueness of *Salmonella senftenberg* 775W. *Appl. Microbiol.* 17: 78～82.

[48] Page, G. V., and M. Solberg. 1980. Nitrogen assimilation by *Salmonella typhimurium* in a chemically defined minimal medium containing nitrate, nitrite, or ammonia. *J. Food Sci.* 45: 75～76, 83.

[49] Perales, I., and A. Audicana. 1988. *Salmonella enteritidis* and eggs. *Lancet* ii: 1133.

[50] Peterson, J. W. 1980. *Salmonella* toxin. *Pharm. Ther.* 11: 719～724.

[51] Reeves, M. W., G. M. Evins, A. A. Heiba, B. D. Plikaytis, and J. J. Farmer. 1989. Clonal nature of *Salmonella typhi* and its genetic relatedness to other salmonellae as shown by multilocus enzyme electrophoresis, and proposal of *Salmonella bongori* comb. nov. *J. Clin. Microbiol.* 27: 313～320.

[52] Rengel, A., and S. Mendoza. 1984. Isolation of *Salmonella* from raw chicken in Venezuela. *J. Food Protect.* 47: 213～216.

[53] Rogers, R. E., and M. F. Gunderson. 1958. Roasting of frozen stuffed turkeys. I. Survival of *Salmonella pullorum* in inoculated stuffing. *Food Res.* 23: 87～95.

[54] Ryan, C. A., M. K. Nickels, N. T. Hargrett-Bean, M. E. Potter, T. Endo, L. Mayer, C. W. Langkop, C. Gibson, R. C. McDonald, R. T. Kenney, N. D. Puhr, P. J. McDonnell, R. J. Martin, M. L. Cohen, and P. A. Blake. 1987. Massive outbreak of antimicrobial-resistant salmonellosis traced to pasteurized milk. *J. Amer. Med. Assoc.* 258: 3269～3274.

[55] Sadler, W. W., and R. E. Corstvet. 1965. Second survey of market poultry for *Salmonella* infec-

tions. *Appl. Microbiol.* 13: 348～351.

[56] Sandefur, P. D., and J. W. Peterson. 1978. Isolation of skin permeability factors from culture filtrates of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* 14: 671～679.

[57] Sandefur, P. D., and J. W. Peterson. 1977. Neutralization of *Salmonella* toxin-induced elongation of Chinese hamster ovary cells by cholera antitoxin. *Infect. Immun.* 15: 988～992.

[58] Sedlock, D. M., L. R. Koupal, and R. H. Deibel. 1978. Production and partial purification of *Salmonella* enterotoxin. *Infect. Immun.* 20: 375～380.

[59] Shrimpton, D. H., J. B. Monsey, B. C. Hobbs, and M. E. Smith. 1962. A laboratory determination of the destruction of alpha amylase and salmonellae in whole egg by heat pasteurization. *J. Hyg.* 60: 153～162.

[60] Stavric, S., and J. -Y. D'Aoust. 1993. Undefined and defined bacterial preparations for the competitive exclusion of *Salmonella* in poultry—A review. *J. Food Protect.* 56: 173～180.

[61] Stavric, S., T. M. Gleeson, B. Blanchfield, and H. Pivnick. 1987. Role of adhering microflora in competitive exclusion of *Salmonella* from young chicks. *J. Food Protect.* 50: 928～932.

[62] St. Louis, M. E., D. L. Morse, M. E. Potter, T. M. DeMelfi, J. J. Guzewich, R. V. Tauxe, P. A. Blake, and the *Salmonella enteritidis* Working Group. 1988. The emergence of Grade A eggs as a major source of *Salmonella enteritidis* infections. *J. Amer. Med. Assoc.* 259: 2103～2107.

[63] Steele, J. H., and M. M. Galton. 1967. Epidemiology of foodborne salmonellosis. *Hlth. Lab. Sci.* 4: 207～212.

[64] Tauxe, R. V. 1991. *Salmonella*: A postmodern pathogen. *J. Food Protect.* 54: 563～568.

[65] Thomason, B. M., W. B. Cherry, and D. J. Dodd. 1977. Salmonellae in health foods. *App Environ. Microbiol.* 34: 602～603.

[66] Troller, J. A. 1976. *Salmonella* and *Shigella*. In *Food Microbiology: Public Health* an *Spoilage Aspects*, ed. M. P. deFigueiredo and D. F. Splittstoesser, 129～155. Westport, CT AVI.

[67] Zaika, L. L., A. H. Kim, and L. Ford. 1991. Effect of sodium nitrite on growth of *Shigell flexneri*. *J. Food Protect.* 54: 424～428.

[68] Zaika, L. L, L. S. Engel, A. H. Kim, and S. A. Palumbo. 1989. Effect of sodium chloride, p and temperature on growth of *Shigella flexneri* *J. Food Protect.* 52: 356～359.

24. 大肠杆菌食物中毒胃肠炎

大肠杆菌（*Escherichia coli*）在1971年被确定为一起食物中毒的病原菌，当时在美国14个州中的进口干酪被一种肠道入侵菌株污染，导致了近400人患病。在1971年以前，其它国家至少报道过5起食物中毒事件，最早的一起是在1947年来自英国（详述见下述）。作为人类病原菌，有证据表明早在18世纪它们就被认为是儿童腹泻的原因[51]。自从1982—1993年间美国发生的肉类食物中毒事件以来，这种菌是一种食物中毒病原菌已经是毫无疑问了。大肠杆菌作为粪便污染的一个指标已经在第六部分18中讨论过，它们的培养和分离方法已经在第四部分10中介绍过，作为检测手段的分子分析和生物分析方法也已经包括在第四部分11和12中。

24.1 血清学分类

埃希氏菌属致病菌株的血清学分类方法与其它肠杆菌科细菌的分类方法相同，其步骤已经在第四部分11中介绍过。对于大肠杆菌，已知的O抗原血清型有200种以上。由于鞭毛蛋白比组成O组的碳水化合物侧链的复杂程度低，所以存在的H抗原类型很少（约为30种）。

24.2 已知的毒性组

根据发病症状和特征，以及对某些细胞培养物和血清组的反应，可以将大肠杆菌分为5个毒性组：肠凝集组（EAggEC）；肠出血组（EHEC）；肠入侵组（EIEC）；肠病原组（EPEC）；肠毒素组（ETEC）。关于这些分组出现的历史，可以参阅文献[40]。

24.2.1 肠凝集组（EAggEC）

这一组（也称肠附着组）与肠病原组相关，但是所显示的凝集附着作用是此组菌株的特征。此组菌株显示出对HEp-2细胞的“叠砖型”附着特性，它们具有一种6×10^7u的质粒，这种质粒是生成菌毛和专一性外层膜蛋白（OMP）的必需成分，菌毛是负责表达凝集作用的结构。诱导出的对抗原型菌株OMP的抗体可以防止对HEp-2细胞的附着[15]。采用来源于原型菌株（O3：H2）6×10^7u质粒中的1.0kb片断，可以组成一种肠凝集组DNA探子[34]。某些肠凝集组菌株可以产生一种耐热肠毒素(ST)，称为EAST1[64]。来源于质粒的编码EAST1的基因是*astA*，它能编码一种含38个氨基酸的分子，而*estA*可以编码含72个氨基酸的肠毒素STa[64]。肠凝集组菌株特有的临床症状是超过14d的持续腹泻，尤其是在儿童患病的情况下。这些菌株并不是旅行腹泻的主要病原菌[11]。

这一组的成员是否是食物中毒病原菌目前还不清楚。某些包括肠凝集组菌株在内的

血清型列在表 24.2 中。两种被定义为原型的血清型是 O3：H2 和 O4：H7，有一种血清型（O44）既含有肠凝集组也含有肠病原组的菌株[66]。

24.2.2 肠出血组（EHEC）

这些菌株既类似于也不类似于肠病原组的菌株。它们与肠病原组菌株的类似之处在于它们具有染色体基因 *eaeA*（或具有类似于这种基因的基因）；并能产生附着-解附作用（参阅肠病原组一段）。与肠病原组相比，肠出血组菌株只影响到大肠（在小猪的试验中），并产生志贺氏菌毒素类似的毒素（SLT 和 Stx，见下述）。肠出血组能产生一种分子质量为 6×10^7u 编码菌毛的质粒，这种菌毛是附着到被感染细胞上所必需的，它们并不能入侵 HEp-2 或 INT407 细胞，虽然有些菌株具有入侵有些人体皮膜细胞的能力[56]。

24.2.2.1 毒素

痢疾志贺氏菌（*Shigella dysenteriae*）能产生一种强力毒素（Shiga toxin），通常被称为志贺毒素（K. Shiga 最早分离和研究这种菌，因此命名）。大肠杆菌肠出血组菌株产生的毒素被认为是志贺类毒素（肠出血毒素、肠细胞出血毒素），其中两种原型被称为 SLT-Ⅰ和 SLT-Ⅱ。但是采用新的命名规则之后，曾被称为 SLT-Ⅰ的现在是 Stx1，而 SLT-Ⅱ现在是 Stx2[7]。在某些肠出血组菌株中，编码 Stx1 和 Stx2 的基因是细菌细胞体内的温和噬菌体。Stx1 与志贺毒素（Stx）有 3 个核苷和 1 个氨基酸不同，它也可以被志贺毒素抗体中和。Stx1 与 Stx2 的区别在于，Stx1 不能被同源多克隆抗血清交叉中和，它们的基因在高度严格的条件下不存在 DNA-DNA 之间的交叉杂交作用[7]。Stx2 和 Stx2e（以前称为 SLT-IIv，VTe）都能被中和 Stx2 的抗血清中和，但是不能被中和 Stx 的抗血清中和。Stx2e 是 Stx2 的衍生物，对维洛细胞（Vero cell）的毒性比对海拉细胞（HeLa cell）更强，与志贺毒素一样，它的基因也是线粒体基因[43,45]。所有志贺类毒素都是维洛细胞的细胞毒素，能致死老鼠，在兔回肠循环试验中呈阳性反应。所有志贺类毒素都是由一种单纯酶激活的 1 个 A 亚基和多个 B 亚基组成。对志贺毒素敏感的细胞具有这些毒素的受体，称为神经酰胺三己糖苷（Gb_3），丁酸钠在促使细胞对志贺类毒素敏感化方面有所作用[44]。一旦毒素结合到受体 Gb_3 上之后，会通过高尔基网而驻留下来。在寄主细胞内，A 亚基与寄主细胞结合，并从 605 核糖体亚基的 28SrRNA 上释放出一个腺嘌呤残基，这样阻止了蛋白质的合成。B 亚基在与一个 A 亚基结合的情况下产生一种五聚体，这样它们就能负责使毒素结合到中性糖脂受体上。虽然血清型 O157：H7 是这个组的原型，但是志贺类毒素至少可以由 30 种其它血清型产生，其中一些血清型列在表 24.2 中。由于一些未知的原因，Stx2 似乎在出血性大肠炎和溶血性尿毒综合征的病因学上比 Stx1 更有意义[55]。关于这一方面的综述，可以参阅文献33和 55。

24.2.2.2 生长和志贺类毒素的产生

志贺类毒素产生菌株的营养需求与多数其它大肠杆菌菌株不同（参阅第六部分 18）。有关温度对志贺类毒素产生的影响在文献报道中并不一致。在早期的研究中，据发现温度对 Stx1 的合成没有影响，而铁离子抑制了这种毒素的合成[76]。在另一项研究中，志贺类毒素在所有有利于生长的温度下都能产生（图 24.1），但是细胞生长在 21℃下比生长在 37℃下合成的毒素少，尽管在这些场合下细胞数是接近的[1]。在绞碎的烤牛肉制成的

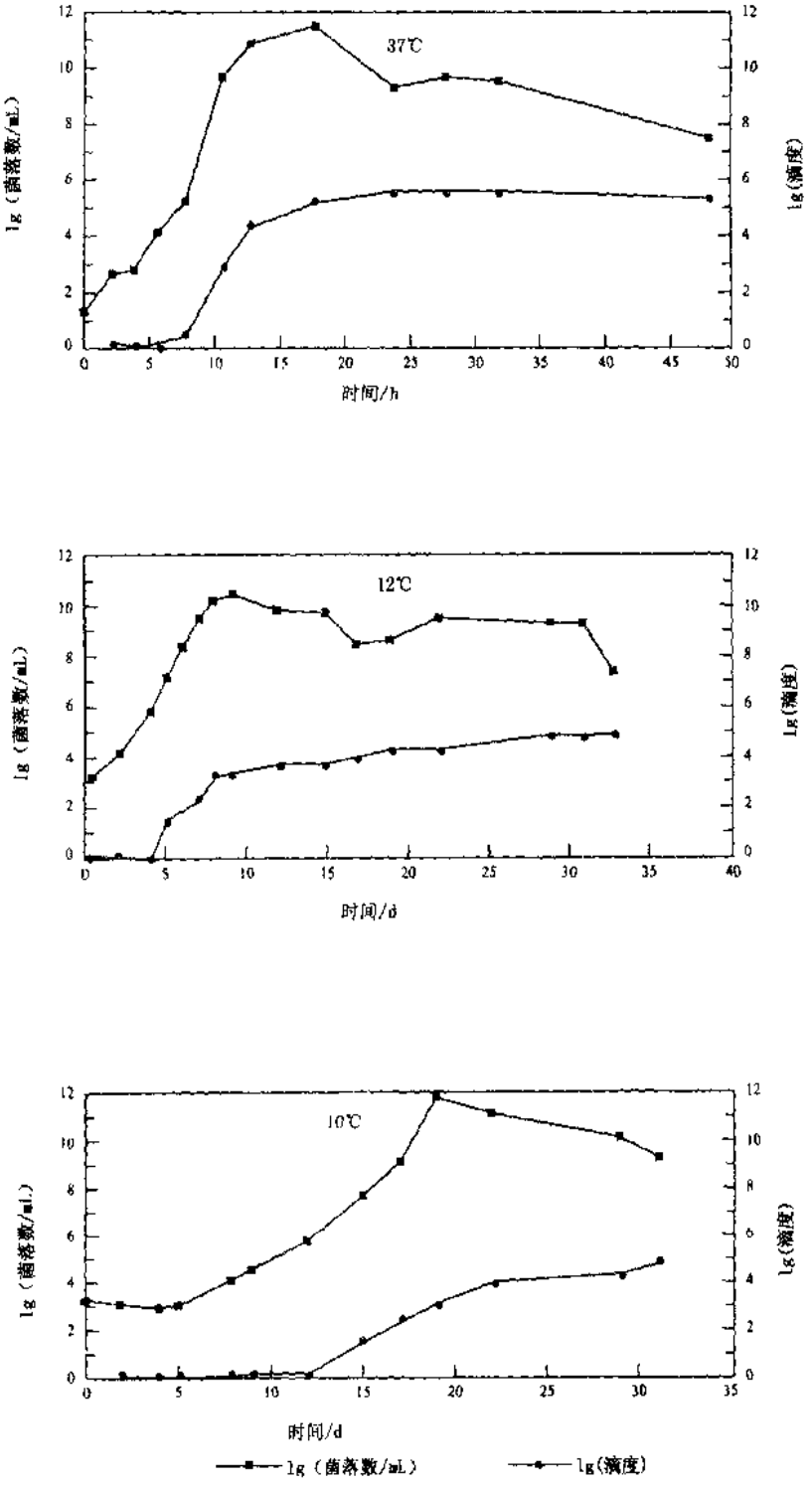


图 21.1 大肠杆菌 A9124-1 在不同温度（37℃，12℃，10℃）下生长和肠出血毒素产生情况

注：摘自 Palumbo et al. [*]，copyright ©1995 by Int. Assoc. Milk, Food, and Environmental Sanitarians.

培养基中，据发现菌株 O157：H7 在 21℃或 37℃生长时，在 24h 内都可以产生志贺类毒素[57]。在一项较早的对于培养在牛乳和新鲜牛肉泥中 O157：H7 菌株的研究中，发现两种培养液中在 37℃下 Stx1 的产生水平都最高，而在 25℃或 30℃下只有痕量水平[58]。上述试验中，Stx1 在新鲜牛肉泥中的产生水平最高（452ng/g），而在牛乳中搅拌 48h 后，最高产生水平只有 306ng/mL。当牛肉泥在 5℃维持 14d 后，未检出有毒素产生。现在尚无证据表明预先产生的志贺类毒素在肠出血组菌株导致的疾病中起任何作用。

关于志贺类毒素在脑心浸出液中的最低产生温度，据发现在 16 支菌株中有 4 株可以在 8℃下生长，但不能在 5℃下生长；另外 12 株可以在 10℃下生长，但不能在 8℃下生长[59]。这 16 支菌株中，有 3 株在 10℃下 4～6d 后增殖了 1000 倍，如同上面提到的那样，志贺类毒素可以在有利于生长的所有温度范围内产生[59]。在 21℃和 37℃下培养后，产生的 Stx1 浓度分别为 63ng/mL 和 85ng/mL[3]。与多数大肠杆菌菌株不同的是，O157：H7 菌株不能生长在 44.5℃下，它们在大肠杆菌培养基中的最高生长温度约为 42℃[67]。

24.2.2.3 环境和物理因素的影响

在一起追溯到新鲜压榨苹果汁引发的中毒事件发生后，人们对肠出血组菌株的耐酸性能给予了更多的重视[5]。该苹果汁的 pH 范围为 3.7～3.9。在一项研究中，EC O157：H7 在 pH＞4.0 的情况下存活了 56d，当时使用的是大豆蛋白胰酶水解液，并用不同的酸调节 pH[12]。在另一项研究中，采用 HCl 调节卢利亚培养基的 pH，在 pH3.0～2.5 和 37℃下培养时，至少在 5h 内 EC O157：H7 菌株的活性没有损失[4]。在一项更细致的研究中，采用 pH3.6～4.0 的苹果汁，EC O157：H7 菌株的接种量为 10^2～10^5/mL，接入的细胞在 25℃下存活了 2～3d[82]。在 8℃下接种 10^3/mL 后，经过 12d 细胞数量只增加了 1 个数量级，但在这一温度下存活了 10～31d。虽然山梨酸钾只有微弱的抑菌效果，但是山梨酸钠在 5℃下使存活时间缩短到了 2～10d，而在 25℃下使存活时间缩短到了 1～2d[62]。经证实，EC O157：H7 菌株可以在用 HCl 调节到 pH4.5 的大豆蛋白胰酶水解液中生长，但是用乳酸调节到这一 pH 时，这种菌株不能生长，这种情况下最低的生长 pH 为 4.6[23]。

在一份对于 EC O157：H7 菌株在商品蛋黄酱中存活性能的研究中，当产品储存在 5℃或 7℃时，这种菌存活了 35d，但是在 25℃储存 72h 后检测不到细胞[74]。这种蛋黄酱的 pH 为 3.65，细胞的接种量约为 10^7cfu/g。在商品蛋黄酱中，即使接种量高达 log6.23/g，然后储存在 5℃、20℃或 30℃时，O157：H7 菌株未见生长，在 5℃下储存 93d 后，细胞几乎接近了不可检出的水平[29]。在另一项研究中，将肠出血组菌株以＞10^6/g 的水平接种到以真蛋黄酱为基料的调味汁或降低热量的奶油蛋黄酱中，在 25℃下存放[19]。试验采用的 pH 范围在 3.21～3.94，这些产品当 pH＜3.6 时会很快致死肠出血组菌株，使得细菌数在 1～3d 内减少了 10^7/g。如果先将肠出血组菌株培养在 pH5.0 左右的酸性环境中，可以增强它们在酸性食品中的存活能力[41]。

在对盐的耐受力方面，在含有 4.5% NaCl 的培养液中 EC O157：H7 菌株在倍增时间内细胞数增长到了原来的 3 倍，而 NaCl 含量为 6.5%时，则出现了一段 36h 的迟滞期，这种条件下的代时为 31.7h[23]。这些研究者还发现 NaCl 浓度大于 8.5%时上述菌株不能生长。在同一项研究中，EC O157：H7 在香肠发酵过程中存活了下来，但是接种 4.8×10^4 后，在 4℃下 2 个月内未见生长[21]。

肠出血组菌株的耐热性与多数革兰氏阴性细菌没有多大差别，事实上，这些菌株似乎比多数沙门氏菌对热更为敏感。一项最近的研究发现，不同肉制品之间的热致死 D 值有所不同，部分产品的 $D_{60℃}$ 值（min）如下[2]：

牛肉　0.45～0.47
猪肉香肠　0.37～0.55
雏鸡　0.38～0.55
火鸡　0.55～0.58

这些 D 值随着脂肪含量的增加而升高是一个普遍现象（参阅第五部分 15）。这些发现支持了一项前期研究的结论，这项研究所报道的高脂牛肉和瘦牛肉的 D 值和 Z 值如下[42]：

30.5%脂肪　D=0.45min，　Z=－13.13℃
2.0%脂肪　D=0.30min，　Z=－13.17℃

在另一项研究中，在低脂牛肉泥中接种约 10^5/g O157：H7 菌株后，在内部温度达 66℃、68℃或 72℃下烹调时，这些细胞均被杀死[20]。

在最近一项对于 EC O157：H7 菌株在苹果汁中耐热性质的研究中发现，在 60℃下加热约 1.6min 后可以获得一个 4-D 过程[67]。这是根据来自 20 次独立试验的结果来定义的，在这 20 次试验中先采用的温度为 52℃，测定出的 D 值范围为 9.5～30min，平均为 18min，一个 Z 值单位为 4.5℃。虽然 L-苹果酸浓度从 0.2%增加到 0.8%，或者 pH 从 4.4 下降到 3.6 时，EC O157：H7 菌株细胞在苹果汁中对热更为敏感，但是 1000mg/kg 苯甲酸是降低这种菌株耐热性的最有效添加剂[67]。

有人对 EC O157：H7 菌株、产单核细胞李斯特菌（*Listeria monocytogenes*）和鼠伤寒沙门氏菌（*Salmonella typhimurium*）在牛肉干中的存活情况进行了研究，在干燥成品中接种约 10^7/g 细胞，10h 或 8 周之后未见有细胞存活[28]。

在肠出血组菌株抗辐射性能方面，没有明显的证据证明它们与其它肠道细菌的差别很大。采用雏鸡接种 EC O157：H7 菌株进行试验时，5℃下的 D 值为 0.27kGy，而在－5℃下的 D 值为 0.42kGy[71]。采用一株非病原菌株的大肠杆菌做试验时，Fielding 等人[21]发现在 pH7.0 左右肉汁中的辐射 D 值约为 0.34kGy，但是当在照射之前将细胞培养在 pH4.0 下时，它的辐射 D 值变为 0.24kGy。关于食品辐照处理的更详细资料请参阅第五部分 13。

24.2.2.4　食品中的发生率

总的来说，肠出血组菌株在肉类、家禽和海产品中的发生率和出现数量是有很大变化的。用 DNA 探子检测肠出血组菌株时，比单独检测 EC O157：H7 菌株时所出现的阳性数要多得多。Doyle 和 Schoeni[17]最早报道了在肉类中肠出血组菌株的出现数量，他们发现 EC O157：H7 菌株在 164 份牛肉样品中的发生率为 3.7%，在 264 份猪肉样品中的发生率为 1.5%，在 263 份禽肉样品中的发生率为 1.5%，在 205 份羊肉样品中的发生率为 2.0%。在泰国，EC O157：H7 菌株被分离出的比例为：零售牛肉 9%、屠宰场牛肉 8%～28%、牛粪 11%～84%[68]。虽然 EC O157：H7 未能从英国香肠中被分离出来，但用一种 DNA 探子在 184 份样品中检测出含肠出血组其它菌株阳性结果的有 25%。从 71 只鸡的 112 份样品中未检出阳性结果[68]。在最近一项对西雅图 1993 年发生的中毒事件

所涉及食品的研究中，在 294 份样品中有 17.3%呈阳性，所分离的菌落中含有 Stx1 和/或 Stx2 菌株[65]。在 51 个呈阳性的菌落中，有 5 个是 Stx1，34 个是 Stx2，12 个是 Stx1 和 Stx2。在 8 次肉类、禽类和海产品的检测中呈现了下述阳性结果：8 份小牛肉有 63%、21 份羊肉有 48%、60 份牛肉有 23%、51 份猪肉有 18%、33 份鸡肉有 12%、62 份鱼有 10%、15 份火鸡有 7%、44 份贝类有 4.5%[66]。在 1993 年太平洋西北部中毒事件发生后，美国农业部食品安全与检测服务处立即对多个州的牛肉和乳畜中的 EC O157：H7 菌株发生率和发生量进行了调查。在 1995 年的一次全国范围的对绞碎牛肉的调查中，食品安全与检测服务处查出的最大发生量为 15 个细胞/g，平均为 4 个细胞/g 新鲜牛肉，在 5291 份样品中，只有 3 份（0.05%）呈 EC O157：H7 菌株阳性。在后来于 1996 年 5 月初采集的 1862 份样品中，未发现阳性样品。

24.2.2.5 乳牛中的发生率

因为肠出血组食物中毒综合征与牛肉的联系比与其它任何一种食品的联系都多，所以现在普遍认为乳牛是这些微生物的主要栖息场所。不论这一结论正确与否，乳牛已是多数研究的对象。总的来说，肠出血组菌株在刚断乳的小牛粪便中的出现数量比年龄较大的牛或成年牛粪便中出现的数量都多，考虑到吃奶期小牛瘤胃中的菌群还没有像成年牛一样建立起来的时候，这一点就不足为怪了。例如，在 1266 份来自小牛、母牛和公牛的粪便样品中，只有 18 份（1.42%）是 EC O157：H7 菌株阳性的[78]。在 662 份来自公牛的样品中，只有 1 份呈阳性，而 210 份小牛的粪便样品中有 5 份呈阳性，394 来自小母牛的样品中有 12 份呈阳性。在来自 2 家农场的 23 份原乳样品中，只有 1 份呈 EC O157：H7 菌株阳性。采用 DNA 探子分析，这些研究中发现 28 株不同的肠出血组菌株有 8%来自成年公牛，有 19%来自小母牛和小公牛[78]。总体来看，肠出血组菌株在所检测的 80%农场中被发现。在 1993 年对来自 14 个州的乳期小牛粪便样品的研究中，965 份样品有 31 份呈 EC O157：H7 菌株阳性[81]。在这 31 份样品中，有 16 份样品可以用直接平板计数分析出是阳性，其中细菌细胞含量为 $10^1 \sim 10^5$ 个/g，其余 15 份样品只有通过富集培养才能分析出是阳性。关于毒素的类型，在这 31 份样品中，有 19 份含有 Stx1 和 Stx2，而其余 12 份只含有 Stx2。

在一项人为感染小牛和成年牛的研究中，Cray 和 Moon[13]发现 EC O157：H7 菌株在小牛体内的驻留时间要比在成年牛体内要长，接种的菌株被限定在胃肠道内，多数感染 EC O157：H7 菌株的牛仍然没有什么临床症状。据认为对于感染成年牛，体外培养的 EC O157：H7 菌株细胞数需要≥10^7cfu[83]。在德国的一项早期研究中，在 259 头健康成年牛中分离的 1387 份分离物中有 10.8%菌株产生的志贺菌类毒素 Stx1 和 Stx2 与 DNA 探子实现了杂交[46]。其中 15.8%志贺菌类毒素阳性菌株只有 Stx1 参与了杂交，而有 38.6%阳性菌株只有 Stx2 参与了杂交。

24.2.2.6 人类发病症状与发生率

导致人类下述综合征的原型菌株是 EC O157：H7。这种 H7 型菌株最早是在 1944 年已从人腹泻粪便样品中分离出来的，而 O157 型菌株最早是 1972 年从猪腹泻粪便中分离出来并命名的[57]。但是，第一支 O157：H7 菌株是 1975 年从一位腹泻患者带血的粪便中分离出来的。大肠杆菌中志贺类毒素产生菌株是 1977 年在美国[52,53]和加拿大[54]被鉴定

命名的。在它最早于1975年被分离出来之后，第二次有记载的EC O157：H7菌株是1978年在加拿大腹泻粪便样品中分离的。

溶血尿毒综合征（HUS）和出血大肠炎（HC）是由大肠杆菌志贺类毒素产生菌株引起的。据估计，有2%～7%比例的EC O157：H7菌株感染能够导致溶血尿毒综合征[24]。溶血尿毒综合征的症状包括溶血性贫血、血小板减少和急性肾脏衰竭。虽然这种综合征直到1985年还未发现与肠出血组菌株有什么直接联系，但是它早在1955年就已经报道过。在德国一项对EC O157：H7菌株在53名儿童体内驻留时间的研究中，28名导致出血大肠炎的儿童体内的持菌时间为2～62d（中间值为13d），而25名导致溶血尿毒综合征的儿童体内的持菌时间为5～124d（中间值为21d）[57]。溶血尿毒综合征更多地与只产生Stx2的菌株有关，而与产生Stx1或Stx1与Stx2的菌株的关系不如与前者密切，但是其中的原因目前还不清楚[58]。据报道，英国在1989—1991年的3年时间内，在1275名分离出肠出血组阳性菌株的患者中，有15%发展成了溶血尿毒综合征[72]。

出血大肠炎作为食物中毒症最早是1982年在美国俄勒冈州和密执安州被发现的，这两起事件中的患者都是食用了快餐馆中含有未烧透牛肉泥的三明治引起发病的[62]。在所涉及的43名患者中，所有患者都有血便腹泻和严重腹痛的症状，其中63%患者还经历了恶心、49%患者呕吐，但是只有7%患者发热。感染的平均潜伏时间为3.8～3.9d，症状可以延续3d至7d以上[62]。其它中毒事件，症状的潜伏时间为3.1～8d。如果要从粪便样品中分离病原菌，需要类症状出现的几天之内化验样品。在开始发病的7d或7d之后，粪便样品的检测可能呈阴性[79]。红色带血粪便是这种综合征的特征，这反映了病原菌驻留在肠道内。发热的症状很少出现，据认为所需的感染剂量只要10个细胞。

多数报道的事件和溶血大肠炎病例与食物和水源有关，到1995年为止的中毒事件概括在表24.1中。虽然多数病例是由大肠杆菌O157：H7引起的，但是1993年发生在新罕布什尔州和罗德岛的中毒事件被追查到了生沙拉，其病症是由血清型O6：NM菌株引起的（NM为不运动）。第一例发生在美国已查明病因的食物中毒事件是由产志贺类毒素的菌株（血清型O104：H21）引起的，而不是由大肠杆菌O157：H7引起的，这起事件的载毒食品是1994年生产的污染巴氏灭菌乳[9]。1995年在澳洲南部发生的中毒事件中，据查证病因是半干香肠中含有的血清型O111：NM菌株，而1992年在意大利，同样的血清型第一次被认为与溶血尿毒综合征有关（这种综合征一般认为与志贺类毒素产生菌株有关），这起事件导致9人患病，其中1人死亡[8]。

表24.1　某些食物和水源起因的大肠杆菌志贺类毒素产生菌株中毒事件

年份	载毒食品	患者数	死亡数	地　点
1982	汉堡肉	26	0	美国俄勒冈州
1982	汉堡肉	21	0	美国密歇根州
1983	汉堡肉	19	0	加拿大艾伯塔
1983	汉堡肉	34	4	美国内布拉斯加州
1984	新堡海产品	42	0	美国缅因州

续表

年份	载毒食品	患者数	死亡数	地　点
1985	冷三明治'其它'	73	19	加拿大安大略
1985	生马铃薯	24	0	英国
1986	原乳	16	0	加拿大安大略
1986	汉堡肉	37	2	美国华盛顿
1987	冷冻牛肉饼	15	2	加拿大艾伯塔
1987	火鸡卷	26	0	英国
1987	牛肉泥'其它'	51	4	美国犹他州
1988	烤牛肉	61	0	美国威斯康星州
1988	蒸冷冻饼	32	0	美国明尼苏达州
1989	水	243	1	美国宾苏甲州 caboul
1990	学校午餐	10	0	美国蒙大拿州
1990	烤牛肉	70	0	美国北达科他州
1991	苹果酒	23	0	美国马萨诸塞州
1992	未知[b]	9	1	意大利
1993	汉堡肉	~800	3	美国华盛顿州、爱达荷州、加利福尼亚州、内华达州
1993	家制夹心饼	10	0	美国加利福尼亚州
1993	田园沙拉[c]	47	—	罗德岛
1993	塔布力沙拉[c]	121	0	美国新罕布什尔州
1994	汉堡包	46	0	美国新泽西州
1994	汉堡包（半熟）	20	0	美国弗吉尼亚州
1994	干腌萨拉米香肠	23	0	美国华盛顿州、加利福尼亚州
1994	污染的巴氏灭菌乳[d]	17	0	美国蒙大拿州
1995	半干发酵香肠[b]	23	1	澳大利亚南部
1995	调味莴苣丝	>100		美国蒙大拿州

[a]也可能人与人之间传染；[b]EC O111：NM；[c]EC O6：NM；[d]EC O104：H21。

24.2.3　肠入侵组（EIEC）

这些菌株一般并不像肠毒素组菌株那样会产生肠毒素，但是它们能侵入结肠皮膜细胞并在其中繁殖，然后能以类似于志贺氏菌入侵的方式扩散到临近细胞内[10]。在20世纪70年代之前，这些微生物中的一些菌株被称为“副结肠菌”（paracolons）。与志贺氏菌一样，肠入侵组菌株具有一种1.4×10^5u的肠入侵质粒（pINV），这种质粒与弗氏志贺氏菌（*Shigella flexneri*）中发现的质粒相当类似，是它们入侵寄主细胞所必需的物质（参阅第七部分23）。缺少质粒的菌株是不能入侵寄主的。典型的肠入侵组菌株也是塞氏反应（Sereny）阳性。这个组的成员具有对结肠的偏好，结果能导致带血或不带血的腹泻。痢疾症状很少出现，幼儿和老人是这种病的敏感人群。这种病的潜伏期为2～48h，平均为

18h[4]。包括肠人侵组菌株的某些血清型列在表 24.2 内。至少有一种血清型（O167）既含有肠人侵组菌株，也含有肠毒素组菌株[25]。

表 24.2　　5 个毒性组中发现的一些 O 血清型

［注意有些血清型（例如 O111）位于一个以上的毒性组中］

肠凝集组	肠出血组	肠人侵组	肠病原组	肠毒素组
3	2	28ac	18ab	6
4	5	29	19ac	8
6	6	112a	55	15
7	4	124	86	20
17	22	135	111	25
14	26	136	114	27
51	38	143	119	63
68	45	144	125	78
73	46	147	126	80
75	82	152	127	85
77	84	164	128ab	101
78	88	167	142	115
85	91		158	128ac
111	103			139
127	113			141
112	104			147
162	111			148
	116			149
	118			153
	145			159
	153			167
	156			
	157			
	163			

某些早期的食物中毒事件概括在表 24.3 中。最早记载的中毒事件于 1947 年发生在英格兰的学校儿童中，鲑鱼显然是当时的载毒食品[30]。虽然食品确实是这种病症的原因之一，但人与人之间的传染也是已知的途径。肠人侵组菌株已经从旅行腹泻症患者的粪便中被分离出来，它们在儿童腹泻的粪便中是普遍存在的[70]。

表 24.3 最早报道的大肠杆菌导致的食物中毒胃肠炎概况

年份	地 点	食品/来源	患者数	接触人数	毒素/菌株类型	血清型
1947	英国	鲑鱼（?）	47	300	肠入侵组	O121
1961	罗马尼亚	代用咖啡饮料	10	50	肠病原组	O86：B7；H34
1963	日本	腌菜	17	31	肠入侵组	O124
1966	日本	蔬菜	244	435	肠入侵组	O124
1967	日本	寿司	835	1736	?	O11（?）
1971	美国[a]	进口干酪	387	?	肠入侵组	O124：H17
1980	美国威斯康星州	食品加工操作者	500	>3000	肠毒素组	O6：H16
1981	美国得克萨斯州	未鉴定	282	3000	肠毒素组（热敏型）	O25：H+
1982	美国俄勒冈州	牛肉泥	26	?	肠出血组	O157：H7
1983	美国[b]	进口布里香肠	?	?	肠毒素组（耐热型）	O27：H20

[a]在 14 个州中；[b]在 4 个州中。

24.2.4 肠病原组（EPEC）

这些菌株一般不产生肠毒素，但是它们能导致腹泻。它们显示了在组织培养细胞上定位附着的性质，能在组织培养基中自动凝集。它们具有含附着因子质粒，能够附着在肠道黏膜上，从而毁坏附着处的微茸毛或导致茸毛伸长。肠病原组细胞然后附着到黏膜细胞膜的突出点上，这样导致了丝状肌动蛋白（F-肌动蛋白）在附着区域的积累。这种附着-解附作用是由染色体基因 *eaeA* 控制的，是肠病原组菌株在小肠和大肠内都能导致的损伤。肠出血组菌株在培养的皮膜细胞上也能显示附着-解附作用[31]。结果是激活了磷脂酰肌醇途径，导致 1,4,5-三磷酸酯和游离钙水平的升高[31]。这种 *eaeA* 基因编码的是一种 9.4×10^4u 的外层膜蛋白，称为附着因子（intimin），它是产生附着-解附作用和附着到 HEp-2 细胞上所必需的[47]。这种附着-解附现象似乎是肠病原组菌株致毒过程中最重要的因素[73]。肠病原组菌株并不能产生可检测量的志贺类毒素。某些肠病原组的血清型列在表 24.2 中。肠病原组菌株最早的特性研究是在 1955 年，当时这些菌株导致了一般在 1 岁以下儿童的腹泻。关于肠病原组早期历史和其它方面的综述，可以参阅文献 16、38 和 40。

24.2.5 肠毒素组（ETEC）

这些菌株能利用茸毛状黏附因子抗原（CFAs）接触和黏附到小肠壁上。这些黏附因子抗原具有 4 种类型：CFA Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ和Ⅳ，它们都已经被克隆和确定了结构顺序[69]。这些黏附因子抗原是由质粒编码的，其编码基因位于编码耐热型肠毒素基因的同一质粒上（见下述），它们在 20℃下不能被合成。一旦黏附到肠壁上之后，它们能产生一种或两种肠毒素。肠毒素组的某些血清型列在表 24.2 中。在一项对来源于 109 名患者的肠毒素组菌株的研究中，产生 ST 毒素和 LT 毒素的菌株比只产生一种这类毒素的菌株在 O：K：H 血清型上更加受到了限制[48]。这些毒素的特征进一步描述如下。

前面已经谈到，肠病原组菌株主要在很年幼的人群中导致腹泻，但是肠毒素组菌株在儿童和成年人群中都能导致腹泻。这些菌株是旅行腹泻症的主要病原菌。肠毒素组菌株引起的综合征很少伴有发热，而腹泻症状发生得很突然。据估计在成年人中，导致腹泻需要的肠毒素组菌株细胞数为 10^8～10^{10}个[51]。

24.2.5.1 肠毒素

大肠杆菌肠毒素中有一类是热敏型毒素（LT），另一类是耐热型毒素（STa 或 ST-Ⅰ和 STb 或 ST-Ⅱ）。致死热敏型肠毒素需要在 60℃下加热约 30min，而耐热型肠毒素能够耐受 100℃、15min 的热处理。

热敏型肠毒素是一种分子质量约为 9.1×10^4u 的蛋白质[14]，它具有类似于霍乱毒素的酶活性（CT）。虽然霍乱毒素可以从产毒细胞的细胞质中分泌到细胞之外，但热敏型肠毒素沉积在产毒细胞膜壁之间的空间内。另外，对付霍乱毒素的抗血清能够中和热敏型肠毒素，对霍乱毒素的免疫作用也能诱导形成对付霍乱毒素和热敏型肠毒素的能力。

这些肠毒素是由产毒菌株在生长的早期阶段产生的，在含有 0.2%葡萄糖的酪蛋白氨基酸-酵母膏培养基中，开始生长 7h 后的耐热型肠毒素生成量最高[47]。在一种合成培养基中，耐热型肠毒素早在 8h 就已经出现，但是在通气的情况下，达到最高产量需要 24h[6]。虽然热敏型肠毒素和耐热型肠毒素在所有允许细胞生长的条件下都能生成，但是在强化培养基中，热敏型肠毒素从细胞中的释放在 pH 7.5～8.5 条件下更好[59]。

热敏型肠毒素由两个原形体组成。A 体：分子质量约为 2.55×10^4u，经过胰蛋白酶处理后变成一个具有酶活力的、分子质量为 2.1×10^4u 的 A_1 多肽链，再利用二硫键与 A_2-形链链接；B 体：分子质量约为 5.9×10^4u，由 5 支非共价键链接的单体多肽链组成[18]。热敏型肠毒素 B 是一种结合亚基，而热敏型肠毒素 A 能激活腺苷酸环化系统。热敏型肠毒素 A 和 B 都具有类似于霍乱弧菌毒素 A 和 B 亚基的免疫性质[36]。热敏型肠毒素 h 和热敏型肠毒素 p 分别是由感染人和猪的菌株产生的。

耐热型肠毒素 a 可以溶解于甲醇，能够引起幼龄鼠的分泌反应。它是具有 18～19 个氨基酸的酸性肽，含有 3 个二硫键，相对分子质量为 1972。它能激活肠道内粒状鸟苷酸环化酶。耐热型肠毒素 a 已经由化学法合成出来[54]。

耐热型肠毒素 b 不能溶解于甲醇，主要来源于感染猪的菌株。它是出现量最多的毒素，与猪腹泻分离物的关系密切，它能作用于断奶小猪的小肠和结扎的回肠，当添加一种蛋白酶抑制剂时它也能作用于鼠肠道的弯曲段[30]。耐热型肠毒素 b 的基因（*estB*）已经被克隆和确定了碱基顺序[39]。这种对胰蛋白酶敏感的耐热型肠毒素 b 已经被合成出来，它是一种含 71 个氨基酸的多肽，在裂解后生成具有 48 个氨基酸的活性分子，其中 4 个半胱氨酸残基能穿过细胞内膜进入膜壁之间的空间。虽然它的作用方式目前还不清楚，但它显示出能促进前列腺素 E_2 合成的功能[27]。在老鼠肠道细胞中，它的受体是一种分子质量为 2.5×10^4u 的蛋白质[26]。

肠毒素的作用方式：肠毒素组菌株导致的胃肠炎是由于摄入了大量（10^6～10^{10}/g）活细胞后，细胞黏附到小肠上和产生肠毒素后引起的。起黏附作用的因子是菌毛或茸毛。这种病的主要特征是不出血的腹泻，粪便中没有炎症的分泌物。这种腹泻的大便呈水样，类似于霍乱弧菌导致的腹泻。这种腹泻来源于肠毒素对肠道内腺苷酸环化酶的激活，这种

酶增加了 3,5-环状腺苷单磷酸（cAMP）的含量。

热敏型肠毒素的 B 原形体能够帮助毒素分子与肠道细胞结合。热敏型肠毒素与神经节苷脂结合，尤其是与单涎腺神经节苷脂（GM_1）结合[18]。霍乱毒素也能与 GM_1 神经节苷脂结合，虽然霍乱毒素与热敏型肠毒素之间没有交叉反应，但它们都是已知的在相应原形体中的共享抗原决定族。在上述结合后，毒素中的 A 多肽链（A 原形体多肽链）催化一种激活腺苷酸环化酶的 G 蛋白 ADP 核糖基化，并诱导细胞内 cAMP 水平升高。

有关耐热型肠毒素方面，耐热型肠毒素 a 与一种高亲和力的专一性非神经节苷脂受体不可逆地结合，引发了一种透过细胞膜的激活粒状鸟苷酸环化酶信号，诱导细胞内环状鸟苷酸（cGMP）的生成。黏膜上水平的升高导致了体液和电解液的损失。耐热型肠毒素与霍乱毒素的不同在于，肠道内鸟苷酸环化酶只有粒状形式才能被耐热型肠毒素激活[22]。耐热型肠毒素 a 与热敏型肠毒素的不同之处在于，前者能激活鸟苷酸环化酶，而后者和霍乱毒素能激活腺苷酸环化酶。耐热型肠毒素 b 能提高细胞内的 5-羟基色胺和前列腺素 E_2 的水平，这两种物质都是肠道分泌作用的促进因子。耐热型肠毒素 b 不激活鸟苷酸环化酶，控制它合成的基因图谱已经被确定[46]，并从它的质粒上克隆了副本[60]。

志贺毒素（Stx1、Stx2、Stx2e）与豆形载体蛋白（蓖麻毒蛋白）的作用机制是相同的。这种机制是由 *N*-葡萄糖苷酶从真核生物 rRNA 的 28S 亚基上切下一个特定的腺嘌呤残基，从而导致蛋白质合成受到抑制[77,54]。

食物和饮水中毒：某些最早报道的由肠毒素组和其它菌株引起的食物中毒事件概括在表 24.3 中。在大肠杆菌的毒素组中，肠入侵组最早在 1947 年被证实是一起食物中毒事件的原因，在美国最早出现是在 1971 年。肠病原组菌株在 1961 年被证实是一起食物中毒事件的病原菌，而肠毒素组在 1980 年，肠出血组在 1982 年。第一起详细记载的人类中毒事件是由水源中的肠毒素组引起的，它 1975 年发生在美国俄勒冈州国家公园中。这起事件涉及的患者约为 2200 人，它们饮用了消毒不当的水，引起发病的肠毒素组菌株为 O6：H16。

24.2.6 预防

一般来说，预防和避免大肠杆菌食物中毒的一些注意事项可以参阅第七部分 20 的最后一节。但是，因为这种病容易侵袭少年儿童，所以还要采取一些特殊措施。这些微生物对热比较敏感，在正常的食物烹调过程中会被杀死，不会引起中毒患病。在使用绞碎的牛肉泥制作馅饼时，推荐的加热温度至少要使饼中心的温度达到 68.3℃，维持时间至少要 15s（美国食品与药物管理局食品编码处推荐）。由于汉堡包的不均匀性，烹调温度要达到 68.3～71.1℃才是一种安全的措施。在烹调之后，汉堡包和其它肉类食品在 4.4～60℃下不能存放 3～4h 以上。虽然有文献记载的最大食物中毒事件与牛肉泥有关，但是其它肉类、禽类和海产品都应该被认为是可能导致出血性大肠炎的带菌食品。

24.2.7 旅行腹泻症

现在已经研究清楚，大肠杆菌是在某些外国旅行者到达时出现的严重水样腹泻的主要病原菌。在泰国维和部队的 35 名志愿兵中，有 57%的人在到达这个国家的前 5d 中患

上了腹泻综合征，其中50%的人显示了肠毒素组菌株感染的症状。在1976年，一起发生于船上的胃肠炎被查出是由只产生热敏型肠毒素的血清型O25：K98：NM菌株引起的。从不同国家旅行腹泻症患者粪便中也分离出了类似的菌株，以及肠病原组和产生耐热型肠毒素的菌株。

与旅行腹泻综合征有关的其它微生物有：轮状病毒（Rotaviruse）、诺沃克病毒（Norwalk agent）、溶组织内阿米巴（*Entamoeba histolytica*）、小肠结肠炎耶尔森菌（*Yersinia enterocolitica*）、兰氏贾第鞭毛虫（*Giardia lamblia*）、空肠弯曲菌（*Campylobacter jejuni*）、大肠弯曲菌（*Campylobacter coli*）、志贺菌（*Shigella*），还可能有：嗜水气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*）、肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）和阴沟肠杆菌（*Enterobacter cloacae*）。

参 考 文 献

[1] Abdul-Raouf, U. M., L. R. Beuchat, T. Zhao, and M. S. Ammar. 1995. Growth and verotoxin I production by *Escherichia coli* O157：H7 in ground roasted beef. *Int. J. Food Microbiol.* 23：79～88.

[2] Ahmed, N. M., D. E. Conner, and D. L. Huffman. 1995. Heat-resistance of *Escherichia coli* O157：H7 in meat and poultry as affected by product composition. *J. Food Sci.* 60：606～610.

[3] Baudry, B., S. J. Savarino, P. Vial, J. B. Kaper, and M. M. Levine. 1990. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J. Infect. Dis.* 161：1249～1251.

[4] Benjamin M. M., and A. R. Datta. 1995. Acid tolerance of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61：1669～1672.

[5] Besser, R. E., S. M. Lett, J. T. Weber, M. P. Doyle, T. J. Barrett, J. G. Wells, and P. M. Griffin. 1993. An outbreak of diarrhea and hemolytic uremic syndrome from *Escherichia coli* O157：H7 in fresh-pressed apple cider. *JAMA* 269：2217～2220.

[6] Burgess, M. N., R. J. Bywater, C. M. Cowley, N. A. Mullan, and P. M. Newsome. 1978. Biological evaluation of a methanol-soluble, heat stable *Escherichia coli* enterotoxin in infant mice, pigs, rabbits, and calves. *Infect. Immun.* 21：526～531.

[7] Calderwood, S. B., D. W. K. Acheson, G. T. Keusch, T. J. Barrett, P. M. Griffin, N. A. Strockbine, B. Swaminathan, J. B. Kaper, M. M. Levine, B. S. Kaplan, H. Karch, A. D. O'Brien, T. G. Obrig, Y. Takeda, P. I. Tarr, and I. K. Wachsmuth. 1996. Proposed new nomenclature for SLT (VT) family. *ASM News* 62：118～119.

[8] Caprioli, A., I. Luzzu, F. Rosmini, C. Resti, A. Edefonti, F. Perfumo, C. Farina, A. Goglio, A. Gianviti, and G. Bizzoni. 1994. Communitywide outbreak of hemolytic-uremic syndrome associated with non-O157 verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 169：208～211.

[9] Centers for Disease Control and Prevention. 1995. Outbreak of acute gastroenteritis attributable to *Escherichia coli* serotype O104：H21-Helena, Montana, 1994. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 44：501～503.

[10] Cheasty, T., and B. Rowe. 1983. Antigenic relationships between the enteroinvasive *Escherichia*

coli O antigens O28ac, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, and O164 and *Shigella* O antigens. *J. Clin. Microbiol.* 17: 681～684.

[11] Cohen, M. B., J. A. Hawkins, L. S. Weckbach, J. L. Staneck, M. M. Levine, and J. E. Heck. 1993. Colonization by enteroaggregative *Escherichia coli* in travelers with and without diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* 31: 351～353.

[12] Conner, D. E., and J. S. Kotrola. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157：H7 under acidic conditions. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 382～385.

[13] Cray, W. C., Jr., and H. W. Moon. 1995. Experimental infection of calves and adult cattle with *Escherichia coli* O157：H7. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1586～1590.

[14] Dallas, W. S., D. M. Gill, and S. Falkow. 1979. Cistrons encoding *Escherichia coli* heatlabile toxin. *J. Bacteriol.* 139: 850～858.

[15] Debroy, C., J. Yealy, R. A. Wilson, M. K. Bhan, and R. Kumar. 1995. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63: 2873～2879.

[16] Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 60: 3953～3961.

[17] Doyle, M. P., and J. L. Schoeni. 1987. Isolation of *Escherichia coli* O157：H7 from retail fresh meats and poultry. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 2394～2396.

[18] Eidels, L., R. L. Proia, and D. A. Hart. 1983. Membrane receptors for bacterial toxins. *Microbiol. Rev.* 47: 596～620.

[19] Erickson, J. P., J. W. Stamer, M. Hayes, D. N. McKenna, and L. A. van Alstine. 1995. An assessment of *Escherichia coli* O157：H7 contamination risks in commercial mayonnaise from pasteurized eggs and environmental sources, and behavior in low-pH dressings. *J. Food Protect.* 58: 1059～1064.

[20] Fenton, L. L., L. W. Hand, T. G. Rehberger, F. K. Ray, and T. G. Harbolt. 1995. Fate of *Escherichia coli* O157：H7 in thermally processed low fat ground beef patties. *Proc. Inst. Food Technol.*, p. 36.

[21] Fielding, L. M., P. E. Cook, and A. S. Grandison. 1994. The effect of electron beam irradiation and modified pH on the survival and recovery of *Escherichia coli*. *J. Appl. Bacteriol.* 76: 412～416.

[22] Frantz, J. C., L. Jaso-Friedman, and D. C. Robertson. 1984. Binding of *Escherichia coli* heatstable enterotoxin to rat intestinal cells and brush border membranes. *Infect. Immun.* 43: 622～630.

[23] Glass, K. A., J. M. Loeffelholz, J. P. Ford, and M. P. Doyle. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157：H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Appl. Environ. Microbiol.* 58: 2513～2516.

[24] Griffin, P. M., and R. V. Tauxe. 1991. The epidemiology of infections caused by *Escherichia coli* O157：H7, other enterohemorrhagic *E. coli*, and the associated hemolytic uremic syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13: 60～98.

[25] Gross, R. J., L. V. Thomas, T. Cheasty, N. P. Day, B. Rowe, M. R. F. Toledo, and L. R. Trabulsi. 1983. Enterotoxigenic and enteroinvasive *Escherichia coli* strains belonging to a new O Group, O167. *J. Clin. Microbiol.* 17: 521～523

[26] Hitotsubashi, S., Y. Fujii, and K. Okamota. 1994. Binding protein for *Escherichia coli* heatstable

enterotoxin Ⅱ in mouse intestinal membrane. *FEMS Microbiol. Lett.* 122: 297～302.

[27] Hitotsubashi, S., Y. Fujii, H. Yamanaka, and K. Okamoto. 1992. Some properties of purified *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin Ⅱ. *Infect. Immun.* 60: 4468～4474.

[28] Harrison, J., and M. Harrison. 1995. Fate of *Escherichia coli* O157 : H7, *Listeria monocytogenes*, and *Salmonella typhimurium* during preparation and storage of beef jerky. *Proc. Inst. Food Technol.*, p. 30.

[29] Hathcox, A. K., L. R. Beuchat, and M. P. Doyle. 1995. Death ofenterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in real mayonnaise and reduced-calorie mayonnaise dressing as influenced by initial population and storage temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4172～4177.

[30] Hobbs, B. C., M. E. M. Thomas, and J. Taylor. 1949. School outbreak of gastroenteritis associated with a pathogenic paracolon bacillus. *Lancet* 2: 530～532.

[31] Ismaili, A., D. J. Philpott, M. T. Dytoc, and P. M. Sherman. 1995. Signal transduction responses following adhesion of verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63: 3316～3326.

[32] Karch, H., H. Russmann, H. Schmidt, A. Schwarzkopf, and J. Heeseman. 1995. Long-term shedding and clonal turnover of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in diarrheal diseases. *J. Clin. Microbiol.* 33: 1602～1605.

[33] Karmali, M. A. 1989. Infection by verocytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 2: 15～38.

[34] Klipstein, F. A., R. F. Engert, and R. A. Houghten. 1983. Properties of synthetically produced *Escherichia coli* heat stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 39: 117～121.

[35] Konowalchuk, J., J. I. Speirs, and S. Stavric. 1977. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 18: 775～779

[36] Kunkel, S. L., and D. C. Robertson. 1979. Purification and chemical characterization of the heat-labile enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 25: 586～596.

[37] Lallier, R., S. Lariviere, and S. St-Pierre. 1980. *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin: Rapid method of purification and some characteristics of the toxin. *Infect. Immun.* 28: 469～474.

[38] Law, D. 1994. Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 152～153.

[39] Lee, C. H., S. L. Moseley, H. W. Moon, S. C. Whipp, C. L. Gyles, and M. So. 1983. Characterization of the gene encoding heat-stable toxin Ⅱ and preliminary molecular epidemiological studies of enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin Ⅱ producers. *Infect. Immun.* 42: 264～268.

[40] Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: Enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. *J. Infect. Dis.* 155: 377～389.

[41] Leyer, G. J., L. L. Wang, and E. A. Johnson. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157 : H7 increases survival in acidic foods. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3752～3755.

[42] Line, J. E., A. R. Fain Jr., A. B. Moran, L. M. Martin, R. V. Lechowich, J. M. Carosella, and W. L. Brown. 1991. Lethality of heat to *Escherichia coli* O157 : H7 :D-value and z value determinations in ground beef. *J. Food Protect.* 54: 762～766.

[43] Lior, H. 1994. *Escherichia coli* O157 : H7 and verotoxigenic *Escherichia coli* (VTEC). *Dairy Food Environ. Sanit.* 14: 378～382.

[44] Louise, C. B., S. A. Kaye, B. Boyd, C. A. Lingwood, and T. G. Obrig. 1995. Shiga toxinassociated hemolytic uremic syndrome: Effect of sodium butyrate on sensitivity of human umbilical vein endothelial cells to Shiga toxin. *Infect. Immun.* 63: 2766～2769.

[45] Marier, R., J. G. Wells, R. C. Swanson, W. Callahan, and I. J. Mehlman. 1973. An outbreak of enteropathogenic *Escherichia coli* foodborne disease traced to imported French cheese. *Lancet* 2: 1376～1378.

[46] Mazaitis, A. J., R. Maas, and W. K. Maas. 1981. Structure of a naturally occurring plasmid with genes for enterotoxin production and drug resistance. *J. Bacteriol.* 145: 97～105.

[47] McKee, M. L., A. R. Melton-Celsa, R. A. Moxley, D. H. Francis, and A. D. O'Brien. 1995. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 requires intimin to colonize the gnotobiotic pig intestine and to adhere to HEp-2 cells. *Infect. Immun.* 63: 3739～3744.

[48] Merson, M. H., F. Orskov, I. Orskov, R. B. Sack, I. Huq, and F. T. Koster. 1979. Relationship between enterotoxin production and serotype in enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 23: 325～329.

[49] Montenegro, M. A., M. Bülte, T. Trumpf, S. Aleksic, G. Reuter, E. Bulling, and R. Helmuth. 1990. Detection and characterization of fecal verotoxin-producing *Escherichia coli* from healthy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1417～1421.

[50] Mundell, D. H., C. R. Anselmo, and R. M. Wishnow. 1976. Factors influencing heat labile *Escherichia coli* enterotoxin activity. *Infect. Immun.* 14: 383～388.

[51] Neill, M. A., P. I. Tarr, D. V. Taylor, and A. F. Trofa. 1994. *Escherichia coli*. In *Foodborne Disease Handbook: Diseases Caused by Bacteria*, eds. Y. H. Hui, J. R. Gorham, K. D. Murrell, and D. O. Cliver, 169～213. New York: Marcel Dekker.

[52] O'Brien, A. D., M. R. Thompson, J. R. Cantey, and S. B. Formal. 1977. Production of *Shigella dysenteriae*-like toxins by pathogenic *Escherichia coli*. Abstr., Amer. Soc. Microbiol., p. 32.

[53] O'Brien, A. D., and R. K. Holmes. 1987. Shiga and Shiga-like toxins. *Microbiol. Rev.* 51: 206～220.

[54] O'Brien, A. D., V. L. Tesh, A. Donohue-Rolfe, M. P. Jackson, S. Olsnes, K. Sandvic, A. A. Lindberg, and G. T. Keusch. 1992. Shiga toxin: Biochemistry, genetics, mode of action, and role in pathogenesis. *Curr. Topics Microbiol. Immunol.* 180: 65～94.

[55] Oelschlaeger, T. A., T. J. Barrett, and D. J. Kopecko. 1994. Some structures and processes of human epithelial cells involved in uptake of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 strains. *Infect. Immun.* 62: 5142～5150.

[56] Orskov, I., F. Orskov, B. Jann, and K. Jann. 1977. Serology, chemistry, and genetics of O and K antigens of *Escherichia coli*. *Bacteriol. Rev.* 41: 667～710.

[57] Ostroff, S. M., P. I. Tarr, M. A. Neill, J. H. Lewis, N. Hargrett Bean, and J. M. Kobayashi. 1989. Toxin genotypes and plasmid profiles as determinants of systemic sequelae in *Escherichia coli* O157 : H7 infections. *J. Infect. Dis.* 160: 994～998.

[58] Palumbo, S. A., J. E. Call, F. J. Schultz, and A. C. Williams. 1995. Minimum and maximum temperatures for growth and verotoxin production by hemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *J. Food Protect.* 58: 352～356.

[59] Picken, R. N., A. J. Mazaitis, W. K. Maas, M. Rey, and H. Heyneker. 1983. Nucleotide

sequence of the gene for heat-stable enterotoxin Ⅱ of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 42: 269～275.

[60] Raghubeer, E. V., and J. R. Matches. 1990. Temperature range for growth of *Escherichia coli* serotype O157 : H7 and selected coliforms in *E. coli* medium. *J. Clin. Microbiol.* 28: 803～805.

[61] Riley, L. W., R. S. Remis, S. D. Helgerson, H. B. McGee, J. G. Wells, B. R. Davis, R. J. Hebert, E. S. Olcott, L. M. Johnson, N. T. Hargrett, P. A. Blake, and M. L. Cohen. 1983. Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *N. Engl. J. Med.* 308: 681～685.

[62] Samadpour, M., J. E. Ongerth, J. Liston, N. Tran, D. Nguyen, T. S. Whittam, R. A. Wilson, and P. I. Tarr. 1994. Occurrence of Shiga-like toxin-producing *Escherichia coli* in retail fresh seafood, beef, lamb, pork, and poultry from grocery stores in Seattle, Washington. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1038～1040.

[63] Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci., USA* 90: 3093～3097.

[64] Smith, H. R., S. M. Scotland, G. A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava. 1994. Isolates of *Escherichia coli* O44: 18 of diverse origin are enteroaggregative. *J. Infect. Dis.* 170: 1610～1613.

[65] Smith, H. B., T. Cheasty, D. Roberts, A. Thomas, and B. Rowe. 1991. Examination of retail chickens and sausages in Britain for vero cytotoxin-producing *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2091～2093.

[66] Splittstoesser, D. F., M. R. McClellan, and J. J. Churey. 1996. Heat resistance of *Escherichia coli* O157 : H7 in apple juice. *J. Food Protect.* 59: 226～229.

[67] Suthienkul, O., J. E. Brown, J. Seriwatana, S. Tienthongdee, S. Sastravaha, and P. Echeverria. 1990. Shiga-like toxin producing *Escherichia coli* in retail meats and cattle in Thailand. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1135～1139.

[68] Taniguchi, T., Y. Fujino, K. Yamamoto, T. Miwatani, and T. Honda. 1995. Sequencing of the gene encoding the major pilin of pilus colonization factor antigen Ⅲ (CFA/Ⅲ) of human enterotoxigenic *Escherichia coli* and evidence that CFA/Ⅲ is related to type Ⅳ pili. *Infect. Immun.* 63: 724～728.

[69] Taylor, D. N., P. Echeverria, O. Sethabutr, C. Pitarangsi, U. Leksomboon, N. R. Blacklow, B. Rowe, R. Gross, and J. Cross. 1988. Clinical and microbiologic features of *Shigella* and enteroinvasive *Escherichia coli* infections by DNA hybridization. *J. Clin. Microbiol.* 26: 1362～1366.

[70] Thayer, D. W., and G. Boyd. 1993. Elimination of *Escherichia coli* O157 : H7 in meats by gamma irradiation. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1030～1034.

[71] Thomas, A., H. Chatt, T. Cheasty, H. R. Smith, J. A. Frost, and B. Rowe. 1993. Very cytotoxinproducing *Escherichia coli*, particularly serogroup 0157, associated with human infections in the United Kingdom: 1989～1991. *Epidemiol. Infect.* 110: 591～600.

[72] Tzipori, S., R. Gibson, and J. Montanaro. 1989. Nature and distribution of mucosal lesions associated with enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* in piglets and the role of plasmid-mediated factors. *Infect. Immun.* 57: 1142～1150.

[73] Weagant, S. D., J. L. Bryant, and D. H. Bark. 1994. Survival of *Escherichia coli* O157 : H7

in mayonnaise and mayonnaise-based sauces at room and refrigerated temperatures. *J. Food Protect.* 57: 629～631.

[74] Weeratna, R. D., and M. P. Doyle. 1991. Detection and production of verotoxin 1 in *Escherichia coli* O157 : H7 in food. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 2951～2955.

[75] Weinstein, D. L., R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1988. Effects of iron and temperature on Shiga-like toxin I production by *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 56: 106～611.

[76] Weinstein, D. L., M. P. Jackson, L. P. Perera, R. K. Holmes, and A. D. O'Brien. 1989. In vivo formation of hybrid toxins comprising Shiga toxin and the Shiga-like toxins and role of the B subunit in localization and cytotoxic activity. *Infect. Immun.* 57: 3743～3750.

[77] Wells, J. G., L. D. Shipman, K. D. Greene, E. G. Sowers, J. H. Green, D. N. Cameron, F. P. Downes, M. L. Martin, P. M. Griffin, S. M. Ostroff, M. E. Potter, R. V. Tauxe, and I. K. Wachsmuth. 1991. Isolation of *Escherichia coli* serotype O157 : H7 and other Shiga-like-toxin-producing *E. coli* from dairy cattle. *J. Clin. Microbiol.* 29: 985～989.

[78] Wells, J. G., B. R. Davis, K. Wachsmuth, L. W. Riley, R. S. Remis, R. Sokolow, and G. K. Morris. 1983. Laboratory investigation of hemorrhagic colitis outbreaks associated with a rare *Escherichia coli* serotype. *J. Clin. Microbiol.* 18: 512～520.

[79] Whipp, S. C. 1990. Assay for enterotoxigenic *Escherichia coli* heat-stable toxin b in rats and mice. *Infect. Immun.* 58: 930～934.

[80] Zhao, T., M. P. Doyle, J. Shere, and L. Garber. 1995. Prevalence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in a survey of dairy herds. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1290～1293.

[81] Zhao, T., M. P. Doyle, and R. E. Besser. 1993. Fate of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 : H7 in apple cider with and without preservatives. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 2526～2530.

25. 弧菌、耶尔森氏菌和弯曲菌食物中毒胃肠炎

25.1 弧菌病（副溶血弧菌）

虽然其它多数已知的食物中毒综合征可能与多种食品有关，但是副溶血弧菌胃肠炎几乎只是与海产品有关。如果涉及到其它食品，则很可能是这些食品与海产品发生了交叉感染。这种病的另一个特征是它的病原菌的自然生态是在海中。除了导致胃肠炎的作用之外，副溶血弧菌是已知的人类肠道外感染的病原菌。

弧菌属至少有 28 个菌种组成，其中 3 种与副溶血弧菌有联系的生存在水中和海产品中的菌种是：创伤弧菌（*V. vulnificus*）、溶藻弧菌（*V. alginolyticus*）和霍乱弧菌（*V. cholerae*），这些菌种的某些特征性质列在表 25.1 中，它们导致的病症描述如下。

表 25.1 副溶血弧菌与其它 3 种弧菌的差别[8]

菌　种	副溶血弧菌	溶藻弧菌	创伤弧菌	霍乱弧菌
在固体培养基上产生侧面鞭毛	+	+		
杆形	直杆形	直杆形	弯曲杆形	d
VP 试验	-	+ (24h)	−	可变，不稳定
生长在 0%NaCl 中	+	+	−	−
生长在 6%NaCl 中	−	+	+	−
Swarming	+	+	−	−
生成 3-羟基丁酮/双乙酰	−	+	+	+
同化蔗糖	−	+	+	+
同化纤维二糖	−	−	−	−
利用 Putrescine	−	d	−	−
在 TCBS 琼脂上的颜色	绿	黄	绿	黄

注：(1) d 为 11%～90% 菌株呈阳性。

(2) 摘自 Bergey's Manual[8]。

副溶血弧菌通常生存在海洋和沿岸海水中。这种菌能否被检测出与海水的温度有关，只有当温度上升到 19～20℃时，这种菌的数量才能达到可被检测出来的水平。一项对凯撒·皮克海湾罗德河的生态研究发现，这些微生物在冬季潜伏在海床沉积物中，然后再释放到海水中，在 4 月至 6 月初期间它们依附在浮游生物体内[54]。在海水中，与其它生物相比，它们更多地依附于贝类[55]、据证实，它们常附着在甲壳质颗粒上和挠足类动物上，而大肠杆菌（*Escherichia coli*）和荧光假单胞菌（*Pseudomonas fluorescens*）没有这种附着能力[54]。这种菌一般在开阔的海域中不能发现，也不能耐受深海的静压力[105]。

25.1.1 生长条件

副溶血弧菌能够生长在含有 1%～8% NaCl 的培养基中，最适生长的 NaCl 含量范围在 2%～4%[104]。这种菌在蒸馏水中会死亡。它在 4℃下不能生长，但是可以生长在 5～9℃，pH7.2～7.3 和 3%NaCl 存在的条件下，或生长在 pH7.6 和 7%NaCl 存在的条件下（表 25.2）。有人证实这种菌在食品中 9.5～10℃下可以生长，而在露天水域中的最低生长温度为 10℃[75-77]。副溶血弧菌生长的上限温度是 44℃，最适生长温度范围在 30～35℃[1,105]。它们在 pH4.8～11.0 范围内都能生长，而最适 pH 为 7.6～8.6。从表 25.2 中可以看到，最低生长 pH 与温度和 NaCl 含量有关，有人观察到当温度为 30℃和 NaCl 含量为 3%的情况下，这种菌在 pH4.8 仍能适当地生长，但是当 NaCl 含量达到 7%时，生长的最低 pH 上升到了 5.2[59]。对于其它 5 种菌株，其研究结果是类似的。在最适条件下，这种微生物的代时为 9～13min（大肠杆菌的代时约为 20min）。相应与最短代时的最适生长 A_w 值据发现为 0.992（在含 2.9%NaCl 的大豆胰酶水解液中）。用这后一种培养基在 29℃培养，用不同的溶质控制水分活度时，最低生长的 A_w 值如下：甘油 0.937、KCl0.945、NaCl0.948、蔗糖 0.957、葡萄糖 0.983 和丙烯二醇 0.986[106]。这种微生物不耐热，据报道它的 D 值(45℃)为 0.8～65.1[11]。对于一株在虾肉匀浆中细胞浓度为 500/mL 的菌株，在 60℃需要 1min 才能杀死，但细胞浓度达到 2×10^7 时，80℃维持 15min 后仍有细胞存活[107]。当细胞生长在高温和含有约 7% NaCl 的情况下最为耐热。

表 25.2　副溶血弧菌 ATCC 107914 在含 3%和 7%NaCl TSB 培养基中和不同温度下的最低生长 pH[a]

温度（℃）	最低生长 pH	
	3%NaCl	7% NaCl
5	7.3	7.6
9	7.2	7.1
13	5.2	6.0
21	4.9	5.3
30	4.8	5.2

注：资料摘自 Beuchat[1]。

副溶血弧菌在江河入海口和富营养培养基中生长时，细胞外层蛋白质和脂多糖，以及 K^- 和 K^- 菌株中的碱性磷酸酯酶水平都有所差别[85]。生长在水中 K^- 菌株中的碱性磷酸酯酶水平要略高一些。细胞外层成分的变化可能与副溶血弧菌生活在可以存活但并不很适应的水中的能力有关，这样使得从水中分离这种菌比较困难[59]。

25.1.2 毒性性质

应用最为广泛的检测副溶血弧菌潜在毒性的体外试验是 Kanagawa 反应，在所有副溶血弧菌中，多数毒性菌株为阳性（K^+），多数非毒性菌株为阴性（K^-）。约有 1%海产

品分离物和大约100%胃肠炎患者的分离物是K⁻[161]。K⁺菌株能产生一种耐热型直接溶血素（TDH），K⁻菌株能产生一种热敏型溶血素，有些菌株能产生两种溶血素。一种耐热型相关溶血素（TRH）是一种重要的毒性因子，它至少在某些副溶血弧菌菌株中存在。在临床试验的214株菌株中，52%只产生TDH，24%能产生TDH和TRH，而有11%菌株能产生耐热和热敏两种类型溶血素[111]。在被测试的71株从环境中分离的菌株中，7%菌株对TRH探子呈现弱反应，但是没有菌株对TDH探子呈现反应。Kanagawa反应一般是用人血红细胞在Wagatsuma琼脂培养基中测定的。除了人血红细胞之外，狗和鼠的血红细胞也可以被溶解，兔和羊血红细胞呈现弱反应，马血红细胞不被溶解[105]。为了进行K反应测定，必须先在37℃平板上表面培养18～24h，以观察是否有β-溶血现象出现。在来自腹泻患者的2720株副溶血弧菌中，96%为K⁺，而来自鱼类分离物的650株副溶血弧菌中只有1%为K⁻[21]。一般来说，来自水中的分离物为K⁻。

耐热型直接溶血素相对分子质量为42 000，是一种致毒心脏的细胞毒蛋白，可以致死老鼠[18]，在兔回肠循环试验中诱导一种阳性响应（参阅第四部分12）。它对于老鼠通过腹膜内注射的LD_{50}值为1.5μg，而在兔回肠试验中的剂量为200μg[138]。耐热型直接溶血素的合成受pH的控制，据发现只能在pH5.5～5.6范围内生成[140]。溶血素有助于细胞获得铁卟啉，因为人们观察到溶解红血球的浸出物能增强这种微生物对老鼠的毒性[158]。细胞膜上TDH分子的受体是神经节苷脂G_{T1}和G_{D1a}，前者与溶血素的结合比后者的结合更为牢固[113]。马红血球对于这种溶血素的抗性显然是由于它们不含有这些神经节苷脂[124]。

用于产生耐热型直接溶血素和热敏型溶血素的一种合成培养基已被研制出来，其中丝氨酸和谷氨酸是必不可少的[57]。耐热型直接溶血素在食品中产生以后会一直存留下来。对于半纯化的毒素，据发现在pH7.0的Tris缓冲液中，$D_{120℃}$和$D_{100℃}$值分别为34min和13min，而在虾肉中，$D_{120℃}$和$D_{100℃}$值分别为21.9min和10.4min[16]。在细胞浓度达到10^6/g时可以检测出溶血素，它的耐热型在pH5.5～6.5下比在pH7.0～8.0下强[59]。

耐热型直接溶血素基因（*tdh*）是线粒体基因，它已经在大肠杆菌中被克隆。当*tdh*基因被导入一株K⁻菌株中时，它能产生细胞外的溶血素[84]。*tdh*基因的核苷顺序已经被确定[84]，一种特定的*tdh*基因探子的结构也已经被确定，它由406对碱基组成[83]，采用这种探子，人们检测出了141种副溶血弧菌菌株。所有的K⁺菌株都是基因阳性菌株——其中86%呈弱阳性而16%K⁻菌株能与上述探子进行反应。采用ELISA方法分析时，所有的基因阳性菌株都能产生耐热型直接溶血素。采用上述基因探子对其它129种弧菌（包括已经命名的19种弧菌）进行分析时，只有霍氏弧菌（*V. hollisae*）是阳性的[83]。大肠杆菌的R-质粒已经被证实转移到了副溶血弧菌中[40]。

至少有12种O抗原和59种K抗原已经被鉴定出来，但是在K⁻和K⁺菌株之间没有鉴定出对应的抗原。一般作为病原学辅助特征的血清型性质，其价值在这里是很小的。

因为并不是所有的K⁻菌株在兔回肠循环试验中都能呈现阳性反应，因为某些K⁻菌株也与胃肠炎有关，而且在有些情况下只分离出了K⁺菌株，所以对它们准确的毒性机理还不清楚。在美国太平洋西北部地区，K⁺和脲酶阳性菌株被发现与中毒症状有关[54]。在美国加利福尼亚州和墨西哥的45名患者粪便分离物中，有71%呈脲酶阳性，91%为K⁺型，它们的血清型是O4：K12[11]。

附着到皮膜细胞上是革兰氏阴性菌一种重要的毒性性质，副溶血弧菌似乎能产生一种与细胞附着能力有关的红血球凝集素，这种凝集素与黏附到肠道黏膜上的作用有关[136]。细菌的菌毛对于它们黏附到肠道细胞上也有一定的作用[40]。

25.1.3 胃肠炎综合征与载毒食品

1951 年，藤野最早鉴定出了副溶血弧菌是一起食物中毒胃肠炎的病原菌[38]。这种中毒病症在美国和某些欧洲国家的发生率是很低的，它在日本是食物中毒的主要原因，在 1965—1974 年间占了日本食物中毒事件的 24%[14,104]。1951 年发生在日本的中毒事件的载毒食品被查清是水煮和半干幼龄沙丁鱼制品，这次事件导致 272 人患病，其中死亡 20 人[104]。日本后来发生的两起事件分别是在 1956 年和 1960 年[104]。美国发生的第一起中毒事件是在 1971 年[71]，蒸螃蟹和螃蟹沙拉是载毒食品，在食用这些食品的 745 人中有 425 人出现了中毒症状，从患者中分离的菌株是 K^+型，血清型为 O4：K11。

关于副溶血弧菌食物中毒的症状，1978 年在美国路易斯安那州发生的中毒症状是最为典型的。中毒的平均潜伏时间为 16.7h（其范围为 3～76h），症状延续时间为 1～8d，平均约为 4.6d。症状（发生的百分率）的表现有：腹泻（95%）、腹痛（92%）、乏力（90%）、恶心（72%）、畏寒（55%）、头痛（48%）和呕吐（12%）。男人和女人都会同样发病，患者年龄为 13～78 岁。据认为，最低的感染剂量约为 10^5。

在一项试验中，14 名摄入细菌细胞数在 10^9 以上的志愿者未见有人发病，但是有人在偶然摄入了 10^7 K^-菌株细胞后确定出现了病症[104]。在另一项研究中，(2×10^7)～(3×10^7) 个 K^+菌株细胞导致志愿者出现了患病症状，而 10^{10} 个 K 菌株细胞未导致患病[105,127]。某些 K^-菌株也与中毒事件有关[7,104]。

这种中毒的载毒食品是海产品，例如牡蛎、小虾、蟹、龙虾、蛤类和有关的贝类。交叉感染可以导致其它食品含菌。

25.2 其它弧菌

25.2.1 霍乱弧菌

霍乱弧菌是来自污染水域的导致人类患霍乱病的著名菌种，在 1992 年以前有 7 次流行的报道。导致流行性霍乱的病原菌属于血清型 O 第 1 组，根据它们的生化特征可以将这一组菌株分成两种生物型（经典型和 El Tor 型）和两种血清型（Inaba 型和 Ogawa 型）。这些在 O 型第 1 组抗血清中不凝集的霍乱弧菌菌株称为非 O1 菌株或非凝集菌株（NAGs）。这些非 O1 菌株被认为是江河入海口的本地细菌，它们广泛分布于这些水域中，虽然它们一般是非病原菌，但是非 O1 菌株是已知能导致人类胃肠炎、软组织感染和败血病的菌株。

前述 7 次霍乱流行是由霍乱弧菌 O1 菌株引起的。其中第 7 次流行是由 O1 菌株生物型 EI Tor 引起的，它开始于 1961 年，结束于 1975 年之后。在 1992 年，在印度次大陆发生了一起霍乱病流行，它是由一种 O1 菌株但是一种新的非 O1 血清型（O139）引起的。

由于它最先在孟加拉湾沿海水域被分离出来，所以称为O139孟加拉菌[52]。这种O139血清型显示的性质一般类似于第7次流行中的O1 El Tor生物型，已有证据表明它是由第7次流行中的分离物演化而来的[56]。因为O139缺乏O1菌株抗原的基因族，所以有人推测它是由El Tor生物型进化到O1菌株途径中的中间型[23]。利用分子指纹方法，O139菌株似乎是来源于上述第7次流行病原菌El Tor菌株的一份克隆[95]。与O1菌株一样，O139菌株含有霍乱毒素基因，但与O1菌株不同的是，O139菌株能生成荚膜，而且据报道它的脂多糖中含有大肠菌糖[95]。

最早由非O1霍乱弧菌菌株导致胃肠炎的报道是1972—1975年间发生在美国的事件，当时有26～28名患者出现急性腹泻症状。虽然有些患者具有系统性感染，但是在这28名患者中，有50%患者粪便中查出了非霍乱型弧菌，而未发现其它病原菌[50]。在另一份1979年呈交到疾病控制中心的关于非O1霍乱弧菌的研究报告中，有9人患了当地获得性胃肠炎，每一位患者都食用了生牡蛎，并在72h内出现了症状[76]。其中的一份分离物中产生了热敏型肠毒素，而没有哪一份能产生耐热型肠毒素。

1981年之前发生的有记载的非O1霍乱弧菌胃肠炎事件至少有5起。那些发生在捷克斯洛伐克和澳大利亚（分别发生在1965年和1973年）的事件被查出是由马铃薯和鸡蛋-芦笋沙拉含毒引起的，所有的患者都具有特征的腹泻症状。第3起事件发生在苏丹，井水是病菌的来源。这3起事件的潜伏期为5h至4d。第4起事件1979年发生在美国佛罗里达州，涉及11人患病，他们食用了生牡蛎。有8人在食用了牡蛎之后48h内出现了腹泻症状，其它3人分别在食用牡蛎后12、15和30h之后出现了综合症状。第5起事件1980年发生在意大利的威尼斯，患病的主要是美国士兵，患病的原因也是食用了生牡蛎。在涉及的约50人中，24人发展成了胃肠炎。这种病的潜伏时间在0.5h至5d，平均为21.5h，发病的症状（百分比）包括：腹泻（91.7%）、腹痛（50%）、腹绞痛（45.8%）、恶心（41.7%）、呕吐（29.2%）和头昏（20.8%），所有患者在1～5d内得以康复，其中有4名患者粪便中分离出了非O1菌株。

关于霍乱弧菌O1菌株导致的食物中毒，1973—1987年间报道至美国疾病控制中心的事件有6起，涉及患病人数916人，其中12人死亡。1973年以前，这种微生物在美国最后一次被报道是在1911年[98]。在上述6起事件中，有3起是贝类和2起是鱼类引起的。1988年8月在美国科罗拉多州发生了1起1人发病的O1菌株感染事件。患者食用了约12只产于路易斯安那州的生牡蛎后，在36h内突然发病，连续腹泻达20次[26]。在患者的粪便中分离出了霍乱弧菌O1 El Tor血清型Inaba。

关于霍乱弧菌的分布，据发现非O1菌株出现在东方国家和墨西哥，它与大肠杆菌一起存在于腹泻患者的粪便中。在1966 -1967年间，在墨西哥城385名腹泻患者的粪便中分离出了霍乱弧菌非O1菌株[14]。在1991年7月，一种血清型Inaba和生物型El Tor菌株被从美国亚拉巴马州莫比尔湾的吞食了牡蛎的鱼体内分离出来。这种菌株与拉丁美洲霍乱流行的菌株没有什么区别，但是与本地的菌株不同。后来在1991年7月和9月，从牡蛎中分离出了另一种菌株。这种菌株直到1992年牡蛎的壳层被打开时仍然存在于其体内。至于拉丁美洲霍乱流行的菌株怎样到达这一区域至今仍然是一个谜。在一份相对滞留比例的研究中，牡蛎体内积聚的霍乱弧菌O1菌株比大肠杆菌或塔拉哈西沙门氏菌

(*S. tallahassee*) 要多[79]。

有一组研究从切萨皮克湾中分离出了 65 支非 O1 菌株[55]。这种菌株的数量在全年中都是很少的，约为每升海水 1～10 个细胞。它们只在盐浓度为 4%～17%的水域中被发现。它们的存在与粪便中出现的大肠杆菌无关，而大肠杆菌的存在与沙门氏菌有关[56]。在这些被研究的菌株中，有 87%的菌株在肾上腺试验、兔回肠循环试验和老鼠致死试验中呈阳性反应。在对美国得克萨斯州、路易斯安那州和佛罗里达州沿海水域的调查中发现，O1 和非 O1 霍乱弧菌在这些海域是普遍存在的。在沿佛罗里达州入海口采集的 150 份海水样品中，57%为霍乱弧菌阳性[32]。在所检验的 753 份分离物中，有 20 份是 O1 菌株、733 份是非 O1 菌株。对这 20 份 O1 菌株的血清型检验结果是，8 份是 Ogawa 型，12 份是 Inaba 型，据发现它们主要存在于污水处理厂中。O1 和非 O1 菌株出现量最多的都是在 8 月和 9 月[32]。粪大肠菌群指数和总大肠菌群指数都不能作为霍乱弧菌存在的充分指标，但是前者比后者要适用一些。在加利福尼亚州沿海的三塔克汝池地区，非 O1 菌株在夏季的月份中出现的数量最多，这时的大肠菌数也较高[61]。O1 和非 O1 菌株已从科罗拉多州的水鸟中被分离出来[86]。这两种类型的菌株也都在得克萨斯州的海湾中存在，对于人体的抗体分析也能证明它们的存在[5,7]。

霍乱弧菌 O1 El Tor 型菌株可以产生一种分子质量为 8.2×10^4u 的原体毒素，并能分泌到培养基中。在培养基中，这种原体毒素进而转化成一种 6.5×10^4u 的活性溶细胞素[135]。非 O1 菌株可以产生一种细胞毒素和一种分子质量为 6.0×10^4u 的溶血素，它在免疫学上与 El Tor 菌株的溶血素有关。外层膜蛋白 U 呈现出一种霍乱弧菌黏附因子的性质，它可以促进细菌对小肠的附着。外层膜蛋白 U 诱导产生的单克隆抗体保护了 HeLa、HEp-2、Caco-2 和 Henle407 皮膜细胞，使这些细胞可以抵抗活性细菌的入侵[113]。

从一份腹泻病旅游患者的粪便中分离出了 1 株 O1 菌株，后来从这个菌株中克隆出了 STa (NAG-STa) 基因[85]。这种非凝集弧菌 STa 基因是染色体基因，它编码的毒素相对分子质量为 8815。这种基因与大肠杆菌 STh 和 STp 基因分别共有 50%和 46%同源性[85]。NAG-ST 毒素可以溶解于甲醇，对幼龄老鼠有毒性，类似于弗氏柠檬酸杆菌 (*Citrobacter freundii*) 毒素[123]。NAG-ST 的单克隆抗体能与小肠结肠炎耶尔森氏菌 (*Yersinia enterocolitica*) 毒素发生交叉反应。另外，拟态弧菌 (*V. mimicus*) 毒素和小肠结肠炎耶尔森氏菌毒素可以被 NAG-ST 的单克隆抗体中和，而不能被大肠杆菌毒素 STh 或 STp 的单克隆抗体中和[124]。

在一份对于霍乱弧菌 El Tor 血清型 Inaba 在食品中的存活力的研究中发现，当肉中的接种量为 2×10^5/g 时，在－5℃温度下 90d 后仍能存活，而在－25℃下存活了 300d[73]。这种菌以 2×10^4/mL 的剂量接种到牛肉中后，在－5℃下 34d 后和在－25℃下 150d 后未能被检出。它在 7℃的牛乳中平均存活了 32d，而在其它食品中只存活了 18～20d。

25.2.2 创伤弧菌

创伤弧菌是在海水和海产品中被发现的。它们在牡蛎和蛤类中比在甲壳贝类中数量更多。这菌种已经被从美国迈阿密州、佛罗里达州至马萨诸塞州科德角的海水中分离出来，其中大多数 (84%) 来源于蛤类。当注射到老鼠体内时，有 82%的试验菌株致死。创

伤弧菌，以及其它一些弧菌，也已被从香港海域的贻贝、蛤类和牡蛎中分离出来，它们的出现比例为6%～9%[2]。创伤弧菌不能在冬季月份从江河入海口的较冷水域中被分离出来，这可能是因为只有以活的但不可培养的形式存在（参阅第四部分10）。如同溶藻弧菌一样（见下述），创伤弧菌能导致软组织感染和人体的初期败血病，尤其是对于患有免疫缺陷和动脉硬化的人。在患败血病的人中致死率大于50%，而对于转化成低血压的患者致死率可达90%以上[134]。这些细菌的入侵能力很强，它们能产生一种分子质量约为5.6×10^{5}u的细胞毒素，对CHO细胞有毒性，并且能溶解血红细胞。但是这种细胞毒素似乎并不是致毒的关键因子[135]。另外，它们还会产生一种分子质量约为3.6×10^{5}u的溶血素[134]。创伤弧菌和霍乱弧菌O1血清型El Tor菌株的结构基因享有类似的区域，这表明它们起源的共同性[136]。创伤弧菌能导致RITARD结扎兔回肠中液体的积累（参阅第四部分12），这表明有一种肠毒素存在[4]。来源于同一种牡蛎的创伤弧菌菌株显示出其基因组有很大的差别，这表明感染牡蛎的是混合菌群，或者在不同的菌株中只有少数具有毒性[22]。

创伤弧菌感染在许多国家是相当普遍的，感染多数发生在5月和10月份，多数病人是40岁以上的男性。创伤弧菌对于含铁水平高于正常值的个体（例如肝炎和慢性动脉硬化患者）是一种危险的病原菌，但是对它的毒性机理目前还不能根据它吸收铁的能力进行圆满的解释。在1981—1992年间，报道至美国佛罗里达州健康部的创伤弧菌病例有125起，其中有25名（35%）患者死亡[3]。生牡蛎是这种细菌的主要来源，据认为，在美国它约占了与所有海产食品有关死亡的95%。有证据表明，将热调料浇到生牡蛎上对杀死创伤弧菌无效[3]，但是双乙酰浓度在0.05%时可以降低牡蛎中创伤弧菌的数量[4]。

25.2.3 溶藻弧菌和霍氏弧菌

溶藻弧菌正常栖息于海水中，它能导致人的软组织和耳部感染。它在1973年被证实是人类的病原菌，但是早在1969年就已经被怀疑是病原菌了[128]。它能使人肢体末端的伤口感染，其中多数患者为曾经接触过海水的男性。

在美国华盛顿州沿岸，这种微生物在无脊椎动物中和沉积物中发现的数量较多，而在开阔的海域发现的数量很少[6]。这种菌在牡蛎中的发现数量与所处海域的水温有关，在温暖水域的数量较多。从在巴西存放不当的牡蛎中，人们分离出了7种弧菌[137]，它们的出现比例分别为：溶藻弧菌（81%）、副溶血弧菌（77%）、霍乱弧菌非O1菌株（31%）、河流弧菌（*V. fluvialis*）（27%）、弗氏弧菌（19%）、拟态弧菌（*V. mimicus*）和创伤弧菌（各12%）。

霍氏弧菌最早在1982年被报道能导致胃肠炎，而在1967—1990年间被报道的病例有15起[138]。在这段时间内，被报道的人食用了贝类后的溶藻弧菌中毒的只有一个病例。霍氏弧菌能产生一种分子质量约为3.3×10^{5}u的肠毒素，它对人和兔的血红细胞具有溶血作用[64]。与副溶血弧菌不同的是，从沿海鱼类中分离的霍氏弧菌产生了一种与耐热型直接溶血素类似的溶血素[89]。采用HeLa、Henle 407和HCT-8单层膜细胞进行试验时，霍氏弧菌能利用微菌毛和微小管侵入这些细胞[74]，这后一种现象表明，这种微生物具有

多种入侵方式。

25.3 耶尔森氏菌病（小肠结肠炎耶尔森氏菌）

耶尔森氏菌属属于肠杆菌科（*Enterobacteriaceae*），它具有 11 个种和 3 种生物型，其中包括导致鼠疫病的鼠疫耶尔森氏菌（*Y. pestis*）。与食物中毒有关的主要是小肠结肠炎耶尔森氏菌（*Y. enterocolitica*）。这种菌最早是在 1933 年由 M. B. Coleman 在美国纽约州分离出来的[47]。这种革兰氏阴性杆菌有点独特之处是它能在 30℃以下运动，而在 37℃下不运动。它在营养琼脂上可以形成 1.0mm 或 1.0mm 以下的菌落，氧化酶阴性、发酵葡萄糖很少产气或不产气，缺少苯丙氨酸脱氨酶，脲酶阳性，是一种独特的嗜冷病原菌。它常常存在于表 25.3 中所示的至少 3 种耶尔森氏菌存在的环境中（见下述）。

表 25.3　在食品环境中与小肠结肠炎耶尔森氏菌有关的耶尔森氏菌和它们之间最低程度的生化性质差别

菌　种	拉丁名称	VP 试验	蔗糖	鼠李糖	棉子糖	蜜二糖
小肠结肠炎耶尔森氏菌	*Y. enterocolitica*	+	−	−	−	−
克氏耶尔森氏菌	*Y. kristensenii*			−	−	−
费氏耶尔森氏菌	*Y. frederiksenii*	+	−	+		
间型耶尔森氏菌	*Y. intermedia*	+	+	+	+	−
伯氏耶尔森氏菌	*Y. bercovieri*		+	−	−	−
莫氏耶尔森氏菌	*Y. mollaretii*	−	−			

注：VP—Voges-Proskauer 试验；+—阳性反应；−—阴性反应。

25.3.1 生长条件

据观察，小肠结肠炎耶尔森氏菌生长的温度范围在−2～45℃，最适生长温度为 22～29℃。29℃似乎是它的生化反应最佳的温度。这种菌的有些菌株的生长上限温度为 40℃，在低于 4～5℃下不能生长。据观察它在 0～2℃的牛乳中 20d 后仍生长。也曾观察到它在 0～1℃的猪肉和鸡肉中生长[67]，有 3 株菌被发现在生牛肉中于 0～1℃下生长了 10d[43]。在 4℃的牛乳中，小肠结肠炎耶尔森氏菌能够生长，7d 后的细胞数量达到了 10^7/mL，并能与乳中存在的微生物群进行竞争[2]。在培养基中加入 NaCl 能使它的最低生长温度升高。在含有 7%NaCl 的脑心浸出液中，在 3℃或 25℃下 10d 之内未见生长。在 pH7.2 条件下，有一株菌在 3℃生长，但是在 pH9.0 和同样的温度下生长极其微弱，而在 pH4.6 和 pH9.6 情况下未见生长[70]。虽然在 3℃下、7%NaCl 具有抑制作用，但是在 5%NaCl 存在的情况下这种菌可以生长。在不含 NaCl 的情况下，这种菌在 3℃和 pH 4.6～9.0 范围内可以生长[119,122]。在临床病人中分离的菌株比自然环境中的分离物受这些因素的影响较少。关于最低生长的 pH，用 HCl 调节时，小肠结肠炎耶尔森氏菌的 6 株菌株培养 21d 出现了下述结果：在 4℃时为 4.42～4.80、7℃为 4.36～4.83、10℃为 4.26～4.50、20℃为 4.18～4.36[20]。当采用有机酸调节 pH 时，它们抑制生长的能力依

次为：醋酸＞乳酸＞柠檬酸。另外，有机酸在大豆胰酶水解液中抑制生长的能力依次为：丙酸＞乳酸＞醋酸＞柠檬酸＞磷酸＞HCl[118]。

培养这种菌的一种化学合成培养基已经被设计出来，它包括4种氨基酸（L-甲硫氨酸、L-谷氨酸、甘氨酸和L-组氨酸）、无机盐、缓冲剂，用葡萄糖酸钾作为碳源[3]。

小肠结肠炎耶尔森氏菌在60℃加热1～3min后会被致死[42]。这种菌对冷冻作用的抗性相当强，在鸡肉中于－18℃下冷藏90d后，它的细胞数只是略有减少[57]。在牛乳中对21株菌株进行的热致死试验中，所计算出的$D_{62.8℃}$值范围为0.7～17.8s，经过巴氏灭菌后未见有细胞存活[37]。

25.3.2 分布

小肠结肠炎耶尔森氏菌及表25.3中所列出的有关菌种广泛分布在陆地、湖水、井水和溪流水源中，这些环境也是温血动物体内这种菌的来源地。它比较适应在动物体内生存，而且表25.3中的菌种从人体中分离出来的数量要比从其它动物体内分离出来的多。在来自人体的149个菌株中，小肠结肠炎耶尔森氏菌、间型耶尔森氏菌、费氏耶尔森氏菌和克氏耶尔森氏菌分别为81%、12%、5.4%和2%[109]。间型耶尔森氏菌和费氏耶尔森氏菌主要发现在淡水、鱼类和食品中，在人体中只是偶尔被分离出来。克氏耶尔森氏菌主要在土壤和其它环境样品，以及食品中被发现，但是从人体中很少能被分离出来[8]。与小肠结肠炎耶尔森氏菌一样，这种菌能产生耐热肠毒素。Hanna等人[44]分离的许多与小肠结肠炎耶尔森氏菌类似的分离物是鼠李糖同化阳性菌，因此它们被归类于间型耶尔森氏菌和/或费氏耶尔森氏菌，它们都能在4℃下生长。鼠李糖同化阳性未见能导致人类患病[109]。

已经分离出小肠结肠炎耶尔森氏菌的动物包括：猫、鸟类、狗、海狸、几内亚猪、骆驼、马、鸡、浣熊、南美栗鼠、鹿、牛、猪、羊羔、鱼和牡蛎。现在普遍认为，猪肉是人体中小肠结肠炎耶尔森氏菌最常见的单类动物来源。在对43份来源于屠宰场的猪肉样品的4种菌（小肠结肠炎耶尔森氏菌、间型耶尔森氏菌、克氏耶尔森氏菌和费氏耶尔森氏菌）检测中，有8份样品呈现阳性，并且被发现了含有所有4种菌种[146]。小肠结肠炎耶尔森氏菌与肺炎克雷伯菌（*Klebsiella pneumoniae*）一起被从美国阿拉斯加州的柯迪克岛捕获的螃蟹中分离出来，它们表现出有致病能力[36]。

25.3.3 血清型与生物型

在人体感染中最常见的小肠结肠炎耶尔森氏菌血清型是O：3、O：5（27）、O：8和O：9。在属于这些血清型的49份分离物中，每一份都有海拉细胞阳性反应，而在39份其它血清型样品中，只有5份呈阳性反应[77]。在美国，多数病原菌株是O：8型（生物型2和3）。在美洲大陆，除了加拿大偶尔能分离出这些菌株之外，其它地区很少有这方面的报道。在加拿大、非洲、欧洲和日本，血清型O：3（生物型4）是最常见的[126]。在欧洲和非洲，其次最常见的是血清型O：9，这种血清型在日本也有报道。血清型O：3（生物型4，噬菌体型9b）实际上是在加拿大魁北克省发现的惟一血清型，而它在安大略省是主要的血清型[126]。其次最常见的血清型是O：5（27）和O：6（30）。在加拿大，O：

3 型在 256 份人体分离样品中占了 85%，而在 22 份非人体来源的样品中 O：5（27）型占了 27%[125]。从猪舌上分离的 6 份 O：8 型菌株可使成年老鼠致死[126]，Mora 和 Pai[775]发现，只有 O：8 型菌株是 Sereny 试验阳性。采用海拉细胞的试验发现，下述血清型菌株具有感染性：O：1、O：2、O：3、O：1、O：5、O：8、O：9 和 O：21[127]。血清型O：8 菌株不仅对人体有毒性，而且在 Sereny 试验中还具有入侵和使老鼠致死的能力。小肠结肠炎耶尔森氏菌最常见的 4 种生物型如表 25.4 所示。在这些生物型中，似乎只有生物型 2、3 和 4 携带有毒性的质粒[65]。

表 25.4 小肠结肠炎耶尔森氏菌 4 种最常见的生物型

底物或产品	生物型			
	1	2	3	4
脂肪酶（叶温 80）	+		-	-
DNA 酶	-		-	+
吲哚	-	+	-	
D 木糖	-	+	-	

25.3.4 毒性性质

小肠结肠炎耶尔森氏菌能产生一种耐热型肠毒素，这种毒素在 100℃下 20min 仍不能杀灭。它也不受蛋白酶和脂肪酶的影响，相对分子质量为 9000～9700，在与 2 巯基乙醇一起加热时会失去其生物活性[87,88]。在进行等电聚焦分析中，据发现其中存在两种组分：等电点 3.29（耐热型肠毒素-1）和 3.00（耐热型肠毒素-2）[87]。来源于几内亚猪的对纯化耐热型肠毒素有免疫性的抗血清可以中和小肠结肠炎耶尔森氏菌耐热型肠毒素和大肠杆菌耐热型肠毒素[87]。与大肠杆菌耐热型肠毒素一样，小肠结肠炎耶尔森氏菌耐热型肠毒素在乳鼠和兔回肠循环分析中能呈现阳性反应，而在 CHO 和 Y-1 肾上腺细胞分析中呈阴性反应（参阅第五部分 12）。它可以溶解于甲醇，在肠道中激活鸟苷酸环化酶和 cAMP 反应，但不能激活腺苷酸环化酶[88,101]。它只能在 30℃或低于 30℃下生成[92]，它的生成在 pH7～8 条件下比较有利。在 46 份乳品分离物中，只有 3 份能在 25℃的牛乳中产生耐热型肠毒素，在 4℃下未见生成这种毒素。在一种合成培养基中，通气能促进肠毒素的生成，但是铁离子含量升高对它的生成有抑制作用[93]。在 25℃的合成培养基中，耐热型肠毒素的生成需要 24h，编码这种毒素的基因似乎是线粒体基因[96]。

在一份对于来自人体的 232 份分离物的研究中，有 94%产生了肠毒素，而在来源于原乳的 44 份样品和其它食品的 55 份样品中，分别只有 32%和 18%产生了肠毒素[95]。在血清型为 O：3、O：8、O：5（27）、O：6（30）和 O：9 的 196 个菌株中，有 97%是肠毒素产生菌。据发现，在美国多数水域中含有的鼠李糖利用阳性菌株要么是血清型不能确定，要么是可以与多种血清型反应[47]。在另一份研究中，对 43 株分离自胃肠炎儿童粪便的和 18 株来自实验室的小肠结肠炎耶尔森氏菌进行了耐热型肠毒素生成检验，采用幼鼠进行试验时，所有的临床分离菌株和 7 株来自实验室的菌株产生了耐热型肠毒素，而在 Y-1 肾上腺细胞分析中所有的菌株都呈阴性反应[92]。关于除了小肠结肠炎耶尔森氏菌

之外的菌种在产生耐热型肠毒素的性能方面，在一项研究中试验的21株间型耶尔森氏菌、8株费氏耶尔森氏菌和1株阿氏耶尔森氏菌（*Y. aldovae*）均未发现生成这种毒素，只有一份来自原乳的分离物呈现阳性，而小肠结肠炎耶尔森氏菌中有62.5%是产耐热型肠毒素阳性菌株[61]。在另外两项研究中发现，在非小肠结肠炎耶尔森氏菌（包括间型耶尔森氏菌和弗氏耶尔森氏菌）中约有三分之一是产耐热型肠毒素阳性菌株[62,63]。

虽然小肠结肠炎耶尔森氏菌病原菌株能产生耐热型肠毒素，但这种毒素似乎在毒性作用中并不是关键的。Schiemann提供了耐热型肠毒素并不具有关键重要性的一些证据[105]，他证实了海拉细胞反应和Sereny试验阳性的血清型O：3菌株不产生肠毒素。另一方面，属于血清型O：3的49份分离物和其它4种有毒性的血清型产生了耐热型肠毒素[77]。

一株血清型O：3菌株携带有一种70kbp的毒性质粒（PYV），可以结合到肠道黏膜上。据认为这种肠道黏膜是小肠结肠炎耶尔森氏菌良好的营养基地，一种外层膜蛋白促进了黏附作用而使毒素固定到黏膜上[64]。借助于这种作用，毒性细胞可以穿过肠道上皮细胞，进入下层淋巴组织，在淋巴组织中对单核细胞血统的细胞进行感染。这种对细胞的入侵作用归因于两种线粒体基因，*inv* 和 *ail*。根据这一设想，所有的致病菌株都应该具有这些基因。环境中分离的菌株具有 *inv*，但是不具有 *ail*。这种 *inv* 基因在非病原菌株中是非功能性基因，病原菌株含有这两种功能性基因，而从环境中分离的菌株具有非功能性的 *inv*，但不具有 *ail* 基因[64]。不论这种微生物的致病机理怎样，O：8血清型（美国最为常见）似乎是在系统感染中比其它血清型更多涉及到的类型。

中毒现象似乎是这种微生物侵入组织的结果。在这种菌的入侵过程中，有一种分子质量为 $4.0\times10^7\sim4.8\times10^7$u 的质粒在起协助作用。小肠结肠炎耶尔森氏菌中的 1.4×10^7u 质粒与鼠疫耶尔森氏菌中的 4.7×10^7u 质粒在约80%的质粒基因组上的DNA之间有55%顺序同源性[65]。除了协助入侵组织之外，这种 $4.0\times10^7\sim5.0\times10^7$u 质粒还负有在37℃下依赖于钙的生长、在组织培养基中自动凝集、血清型O：8菌株对成年鼠的致死、乳鼠的致死、HEp-2细胞的附着和附着在至少3种外层膜蛋白上[66]的作用。这些质粒似乎并不负责肠毒素的生成、HEp-2细胞的入侵或菌毛蛋白的表达。存在于耶尔森氏菌中的其它质粒的分子质量范围为 $3\times10^6\sim3.6\times10^7$u，但是它们与菌株的毒性性质无关[66]。在代表6种血清型和含有 $4.2\times10^7\sim4.4\times10^7$u 质粒的10株菌株中，所有的菌株都能致死乳鼠，而那些不含这些质粒的菌株则不能致死乳鼠[5]。将含有质粒的毒性菌株饲喂给口渴的老鼠后呈现致死作用，而不含质粒的菌株对这些老鼠没有作用[66]。这种质粒在菌株中还负责其它与毒性有关的性质，包括自动凝集、依赖于钙盐的生长、产生V和W抗原、及对血清的抗性。血清型O：8（生物型2）菌株的V和W抗原与鼠疫耶尔森氏菌和假结核耶尔森氏菌（*Yersinia pseudotuberculosis*）的抗原在免疫性质上是一致的[21]。这种有毒性质粒编码的血清抗性因子由外层膜蛋白组成，它是细胞在37℃条件下生长合成的，而在25℃下不能合成[67]。在25℃下生长的细胞比在37℃下生长的细胞更容易黏附到亨勒单层膜上，因此可以更好地耐受血清的致死作用。

虽然对小肠结肠炎耶尔森氏菌的毒性机制还不十分清楚，但是它的某些菌株显示出能在20℃下产生一种广谱性、甘露糖抗性的黏附因子，这种因子至少能在10种动物中凝

集血红细胞。血凝集作用与菌毛有关，这种菌毛当细胞生长在37℃下不能生成。在21、O：3和O：8血清型中，有7株菌产生了凝集性菌毛，而来自多种环境的115株菌株只有46株产生了菌毛。

为了在体外测定这3种血清型中哪一种与毒性作用更为相关，研究中采用钙缺陷型、自动凝集型和含有$4.0\times10^{7}\sim4.8\times10^{7}$u质粒的34支菌株进行了试验。在31株$Ca^{2+}$缺陷型菌株中，有29株呈阳性反应，而在另外两次试验中，所有34株菌都呈阳性反应[1,2]。这些研究者最欣赏在35℃下对自动凝集型菌株在组织培养基中的试验，认为这些试验结果可能是最好的结果。Prpic等人[97]也发现，在体外试验中，自动凝集型菌株是最好的菌株，其次是Ca^{2+}缺陷型菌株。除了小肠结肠炎耶尔森氏菌菌株之外，鼠疫耶尔森氏菌和假结核耶尔森氏菌的毒性菌株也能在组织培养基中自动凝集，而无毒型菌株不能凝集[65]。Schiemann和Devenish[107]认为，这种微生物中涉及毒性的两个最重要的条件是，V和W抗原的存在和一种入侵因子(此因子可以由海拉细胞的感染性得到证实)的存在，但是这种观点还需要有广泛支持的证据。因为含有质粒的菌株可以在腹膜腔内存活而不含质粒的菌株不能在此存活，所以有人认为致病性小肠结肠炎耶尔森氏菌对噬菌作用的抗性是由这种决定性致毒因子起作用的[45]。在后来的研究中发现，补体在毒性方面是不起作用的。当铁离子与右旋糖苷一起通过腹膜注射到老鼠体内时，小肠结肠炎耶尔森氏菌血清型O：3和O：9的中间致死剂量约降低了10倍，而去铁敏（去铁胺B甲基磺酸盐）使这个致死剂量降低了100 000倍以上[100]。血清型O：8菌株受这种化合物的影响较轻，这表明它们对铁的需求量较少。

25.3.5 小肠结肠炎耶尔森氏菌在食品中的发生率

这种微生物曾经被从糕饼、真空包装肉类、海产品、蔬菜、乳类和其它食品中被分离出来。它还曾经被从牛肉、羊肉和猪肉中分离出来[67]。在所有的分离物中，猪肉似乎是人类病原菌的主要来源。

从现宰的31只猪舌上，人们分离出了21株菌，它们代表了6种血清型，其中血清型O：8是最多分离出的血清型，血清型O：6（30）次之[34]。被分离出的其它血清型还有O：3、O：13（7）、O：18和O：46。在美国检验的100份牛乳样品中，有12份原乳和1份巴氏灭菌乳中出现了小肠结肠炎耶尔森氏菌[78]。在法国东部，75份原乳样品中有81%样品在富集培养之后分离出了小肠结肠炎耶尔森氏菌，其中血清型O：5的出现率最高[30]。在澳大利亚山羊原乳的35份分离物中，有71%是鼠李糖利用阳性的[45]。在巴西，219份原乳样品有16.8%和280份巴氏灭菌乳中有13.7%含有耶尔森氏菌，其中的小肠结肠炎耶尔森氏菌、间型耶尔森氏菌和弗氏耶尔森氏菌的发生率分别为34%、65%和2.7%[125]。在巴西的生牛肉和鸡肉中有80%含有耶尔森氏菌，在绞碎的牛肉和肝中有60%和猪肉中有20%也呈阳性[32]。

25.3.6 胃肠炎综合征和发生率

除了胃肠炎之外，这种微生物还与人类的假结核病、肠系膜淋巴腺炎、回肠末端炎、反应性关节炎、腹膜炎、结肠和颈部脓肿、胆囊炎和结节红斑有关，它们可以从患者的

尿液、血液、脑脊髓液和眼中分离出来。当然，它也能从胃肠炎患者的粪便中分离出来。下面只对胃肠炎综合征进行讨论。

这种胃肠炎综合征的发生率与季节有关，在春季发生率最低，而在10月和11月份发生率最高。它在幼儿和老人中的发生率最高。在Gutman等人[41]研究的发病事件中，所出现的症状（出现比例）有：发热（87%）、腹泻（69%）、剧烈腹痛（62%）、呕吐（56%）、咽喉炎（31%）、头痛（18%）。这起事件导致了2人的阑尾被切除，2人死亡。

乳品（原乳，灭菌不当或二次污染）是常见的含耶尔森氏菌食品。美国最早报道的中毒事件1976年发生在纽约州，血清型O：8是这起事件的致病菌性，添加巧克力糖浆到预先制备的巴氏火菌乳中制备的巧克力乳是载毒食品[13]。1988－1989年间在乔治亚州发生了一起15名儿童中毒的事件，病原菌是血清型O：3菌株，载毒食品是生猪肠[25]。

这种胃肠炎可以在摄入含毒食品后几天内出现症状，其特征是异常疼痛和腹泻。儿童似乎比成人更为敏感，导致发病的微生物可以在病愈后在粪便中存活40d[4]。这种胃肠炎还可以引发一系列的不同症状。

25.4 弯曲菌病（空肠弯曲菌）

弯曲菌属（*Campylobacter*）包括约14个菌种，其中与食物中毒最密切相关的是空肠弯曲菌空肠亚种（*C. jejuni* subsp. *jejuni*）。与空肠弯曲菌德莱氏亚种（*C. jejuni* subsp. *doylei*）不同的是，它对头孢霉素具有抗性，能在42℃下生长，并且能还原硝酸盐。在本部分叙述中，空肠弯曲菌空肠亚种被称为空肠弯曲菌。这种菌与大肠弯曲菌（*Campylobacter coli*）的区别是，它可以水解马尿酸。弯曲菌比其它组的细菌与弓形菌属（*Arcobacter*）的亲缘关系更为接近。

在20世纪70年代之前，弯曲菌主要被兽医微生物学家们所研究，因为它们能导致牲畜自发流产和其它动物疾病。这些菌曾经被归类于弧菌属（*Vibrio*）。

空肠弯曲菌是一种纤细的螺旋弯曲菌，在细胞的一端或两端着生有单极鞭毛。它是氧化酶和触酶阳性菌，在25℃、3.5%NaCl的培养基中不能生长。它是微好氧菌，生长需要少量的O_2（3%～6%）。在含氧量达21%的情况下生长实际上被抑制。它需要约10%的CO_2才能良好地生长。当空肠弯曲菌接种到真空包装的加工火鸡肉中时，在4℃储存28d后细胞数有所减少，但仍有相当多的细胞存活[98]。它的代谢是呼吸性的。除了空肠弯曲菌之外，大肠弯曲菌、肠道弯曲菌（*C. intestinalis*）和数种其它弯曲菌是已知能导致人类腹泻的病原菌，但是迄今为止，空肠弯曲菌仍然是最重要的病原菌。

由于空肠弯曲菌的细胞形体较小，所以可以用一种0.65μm过滤器将它们与其它革兰氏阴性细菌分离。空肠弯曲菌是热敏细菌，对于有5支菌株等量组成的混合菌群，它们的$D_{55℃}$值在蛋白胨悬浮液中为1.09min；在绞碎和高温灭菌的鸡肉中为2.25min[15]。当细胞的接种量为10^7/g，加热绞碎牛肉的内部温度达到70℃时，维持约10min后未能检出活的细胞[116]。这种菌对冷冻作用也较敏感，当含有细胞的鸡块在－18℃储存后，其细胞数量大幅度减少或消失。对于人为污染的汉堡肉，这种菌的细胞数量在7d后降低了一个数量级[53]。

25.4.1 分布

与小肠结肠炎耶尔森氏菌和副溶血弧菌不同的是，空肠弯曲菌不是一种环境微生物，而是一种与温血动物有关的微生物。它在所有的肉用动物粪便中的出现比例都很高，其中以家禽粪便中含量最高。它在粪便样品中出现的比例常常为30%～100%。Blaser[6]概括了不同研究所报道的分离物，其中样品和含空肠弯曲菌的阳性比例如下：鸡肠道内容物（39%～83%）、猪粪（66%～87%）、羊粪（73%）、猪肠道内容物（61%）、宰后羊体（24%）、宰后猪体（22%）、去内脏雏鸡体（72%～80%）、去内脏火鸡体（94%）。在对396份冷冻肉和405份新鲜肉样品中空肠弯曲菌和大肠弯曲菌的检测，鲜肉样品约有12%呈阳性，而冻肉样品只有2.3%呈阳性[105]。鸡肝比其它肉类（包括牛肉、猪肉、羊肝，以及这些动物的肌肉）的阳性比例都高，新鲜肝有30%呈阳性，冷冻肝有15%呈阳性。有9个实验室分别对来自零售肉食商店的2000多份样品进行了空肠弯曲菌和大肠弯曲菌的检验[106]，这些菌被发现存在于29.7%鸡肉样品中、4.2%猪肉香肠中、3.6%绞碎牛肉中和约5.1%红肉中。猪肉产品中只分离出了大肠弯曲菌。人们注意到，在6月和9月的发生率（8.6%）比在12月和5月的发生率（分别为4.5%和3.9%）高。关于弯曲菌的生态学和在其它新鲜食品和环境中的发生率可以参阅综述文献[8-10]。

空肠弯曲菌可以出现在腹泻病人的粪便中，这种菌可能是人急性腹泻最常见的病原菌之一[11]。在美国不同地区长达15个月时间内呈交到8家医院实验室中的5097份样品中，空肠弯曲菌的检出比例为4.6%，沙门氏菌的检出比例为2.3%，志贺氏菌的检出比例为1%[12-13]。空肠弯曲菌最多出现在10～29岁的人群中，最高峰的出现时间是在夏季月份。有记载表明发达国家的腹泻病人粪便样品中含有空肠弯曲菌的比例为3%～14%[14]。在笼养鸡中，空肠弯曲菌出现最多的时间是在10月和4月底至5月初[15]。在后来的研究中发现，有8.1%的鸡会长期排泄这种菌，而在长期接触这种排泄物的鸡中，有33%是不带有这种菌的。在鸭加工厂中，老鼠排泄物是空肠弯曲菌最可能的来源，含有这种菌的阳性比例高达86.7%[16]。

在某些家禽制品中，空肠弯曲菌的数量达10^{3}～$10^{4.5}$/g。一旦这种微生物的菌群在鸡舍中建立起来之后，多数家禽会被感染。有一项研究发现，一旦这种菌在任何一只鸡中被发现，会在1周之内在所有同群鸡中出现[107]。除了家禽之外，这种菌的主要来源是原乳。因为这种菌存在于牛粪便中，所以也不奇怪它会出现在牛乳中，可以设想牛乳的污染程度与挤奶的操作有关。在一次对于来自美国威斯康星州原乳大罐的108份样品的检测中，只有1份样品呈空肠弯曲菌阳性，而在一群A级牛群中有64%牛的粪便呈阳性[17]。在荷兰，904份牛粪样品中有22%、904份原乳样品中有4.5%含有空肠弯曲菌[12]。

25.4.2 毒性性质

空肠弯曲菌中至少有一些菌株可以产生热敏型肠毒素（CJT），这些毒素与霍乱弧菌毒素（CT）和大肠杆菌肠毒素（LT）有一些相同的性质。弯曲菌毒素能升高cAMP水平，诱导在中国仓鼠卵巢细胞中的变化，并能导致鼠回肠弯曲部位的液体积累[108]。在一种特定的培养基中，弯曲菌毒素最高的生成量是在42℃下24h产生的，多黏菌素可以促进这

种毒素的产生[56]。不同菌株的产毒量差别很大，从不产毒至产 50ng 毒素蛋白/mL 培养液。采用 Y-1 肾上腺细胞分析时，在细胞先接触林可霉素，然后再接触多黏菌素的情况下，毒素的生成量增加了 1 倍[73]。弯曲菌毒素可以被霍乱毒素和大肠杆菌肠毒素的抗血清中和，这证明了弯曲菌毒素与这两种毒素的免疫学同源性[62]。弯曲菌毒素似乎还与这两种毒素享有同样的细胞受体，并且它还含有在免疫学上与这两种毒素 B 亚基相关的 B 亚基[55]。另外，这种菌还能产生一种细胞毒素，可以作用于维洛细胞核海拉细胞。弯曲菌所产的肠毒素和细胞毒素能够导致兔空肠弯曲部的液体积累，但不能导致老鼠、猪或牛空肠弯曲部的液体积累。部分纯化的肠毒素含有 3 个部分，它们的分子质量分别为 6.8×10^4u、5.4×10^4u 和 4.3×10^4u[73]。在来自肠炎患者和健康蛋鸡的 202 株空肠弯曲菌和大肠弯曲菌中，采用中国仓鼠卵巢细胞进行试验时，分别有 34%空肠弯曲菌和 22%大肠弯曲菌菌株产生了肠毒素[58]。

空肠弯曲菌肠炎似乎部分是由于这种菌的入侵性质引起的。这种看法的证据是它所导致的一些临床症状：感染后凝集素的快速生成、发病的急性阶段能从外围血液中分离出这种菌、以及它们能够进入海拉细胞[70]。但是在 Sereny 试验或安通试验中，空肠弯曲菌没有入侵作用。

入侵 Caco 2 细胞的机理是一种需要能量的过程，而不是一种内吞噬过程[64]。空肠弯曲菌病具有一些后遗症，包括急性感染性多神经炎（关于这种病的综述可以参阅文献 111）。据估计，约有三分之一的患者会在患空肠弯曲菌肠炎后 1～3 周内出现急性感染性多神经炎症状。按照血清型分类方法，空肠弯曲菌有 48 种以上血清型，血清型 19 似乎与急性感染性多神经炎有关。这种菌株具有一种与寄主 GM1 神经节苷脂端部的四糖结构相同的低聚糖结构。因为神经节苷脂是神经表面组织的成分，所以对空肠弯曲菌四糖结构的抗体会呈现一种抗神经作用[107]。

质粒已经被证实存在于空肠弯曲菌细胞内。在所试验的 17 株菌中，有 1 株被发现含有分子质量范围在 1.6×10^6～7.0×10^7u 的质粒，但是它们的作用及在病理中的功能还不清楚。

一份血清型图谱已经被指定出来。82%来源于鸡和 98%来源于人的分离物属于生物型 1[108]。

25.4.3 肠炎综合征

在美国发生的第一起追溯到水源的空肠弯曲菌中毒事件中，约有 2000 人被感染，感染后的症状（带有症状的患者比例）如下：腹痛或腹绞痛（88%）、腹泻（83%）、不舒服（76%）、头痛（54%）、发热（52%）。症状会延续 1～4d。在更为严重的中毒情况下，可能出现类似于溃疡性的大肠炎的血便、腹泻等，而腹痛可能类似于急性阑尾炎的症状[58]。这种肠炎的潜伏期差别很大。一般在 48～82h，但也可能长达 7～10d，甚至更长。腹泻可能延续 2～7d，在症状消失之后，这种菌可能会在体内存留 2 个月以上。

25.5 预防

副溶血弧菌、小肠结肠炎耶尔森氏菌和空肠弯曲菌都是不耐热的细菌，可以在乳品

巴氏灭菌的条件下被致死。预防的措施是要避免食用生的海鲜产品，注意防止被污染原料的交叉感染，这样能消除或显著降低副溶血弧菌和小肠结肠炎耶尔森氏菌所导致的胃肠炎发生率。为了防止伤口被弧菌感染，肢体有伤口者应避免进入海水中。预防耶尔森氏菌要注意避免饮用不够纯净的水，避免饮用生水或杀菌不充分的乳品。预防弯曲菌病要避免食用未煮透或灭菌不充分的食品，尤其是乳品。

参 考 文 献

[1] Abbott, S. L., C. Powers, C. A. Kaysner, Y. Takeda, M. Ishibashi, S. W. Joseph, and J. M. Janda. 1989. Emergence of a restricted bioserovar of *Vibrio parahaemolyticus* as the predominant cause of *Vibrio*-associated gastroenteritis on the West Coast of the United States and Mexico. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2891～2893.

[2] Amin, M. K., and F. A. Draughon. 1987. Growth characteristics of *Yersinia enterocolitica* in pasteurized skim milk. *J. Food Protect.* 50: 849～852.

[3] Amirmozafari, N., and D. C. Robertson. 1993. Nutritional requirements for synthesis of heat-stable enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3314～3320.

[4] Asakawa, Y., S. Akahane, N. Kagata, and M. Noguchi. 1973. Two community outbreaks of human infection with *Yersinia enterocolitica*. *J. Hyg.* 71: 715～723.

[5] Aulisio, C. C. G., W. E. Hill, J. T. Stanfield, and R. L. Sellers, Jr. 1983. Evaluation of virulence factor testing and characteristics of pathogenicity of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 40: 330～335.

[6] Baross, J., and J. Liston. 1970. Occurrence of *Vibrio parahaemolyticus* and related hemolytic vibrios in marine environments of Washington state. *Appl. Microbiol.* 20: 179～186.

[7] Barrow, G. I., and D. C. Miller. 1976. *Vibrio parahaemolyticus* and seafoods. In *Microbiology in Agriculture, Fisheries and Food*, ed. F. A. Skinner and J. G. Carr, 181～195. New York: Academic Press.

[8] N. R. Krieg, ed. 1984. *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, vol. 1. Baltimore: Williams & Wilkins.

[9] Beuchat, L. R. 1973. Interacting effects of pH, temperature, and salt concentration on growth and survival of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.* 25: 844～846.

[10] Beuchat, L. R. 1974. Combined effects of water activity, solute, and temperature on the growth of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Microbiol.* 27: 1075～1080.

[11] Beuchat, L. R., and R. E. Worthington. 1976. Relationships between heat resistance and phospholipid fatty acid composition of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 31: 389～394.

[12] Beumer, R. R., J. J. M. Cruysen, and I. R. K. Birtantie. 1988. The occurrence of *Campylobacter jejuni* in raw cows' milk. *J. Appl. Bacteriol.* 65: 93～96.

[13] Black, R. E., R. J. Jackson, T. Tsai, M. Medvesky, M. Shayegani, J. C. Feeley, K. I. E. MacLeod, and A. M. Wakelee. 1978. Epidemic *Yersinia enterocolitica* infection due to contaminated chocolate milk. *N. Engl. J. Med.* 298: 76～79.

[14] Blake, P. A., R. E. Weaver, and D. G. Hollis. 1980. Diseases of humans (other than cholera) caused by vibrios. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 341～367.

[15] Blankenship, L. C., and S. E. Craven. 1982. *Campylobacter jejuni* survival in chicken meat as a function of temperature. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 88~92.

[16] Blaser, M. J. 1982. *Campylobacter jejuni* and food. *Food Technol.* 36 (3): 89~92.

[17] Blaser, M. J., P. Checko, C. Bopp, A. Bruce, and J. M. Hughes. 1982. *Campylobacter* enteritis associated with foodborne transmission. *Amer. J. Epidemiol.* 116: 886~894.

[18] Brackett, R. E. 1987. Effects of various acids on growth and survival of *Yersinia enterocolitica*. *J. Food Protect.* 50: 598~601.

[19] Bradshaw, J. G., D. B. Sha, A. J. Wehby, J. T. Peeler, and R. M. Twedt. 1984. Thermal inactivation of the Kanagawa hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* in buffer and shrimp. *J. Food Sci.* 49: 183~187.

[20] Brocklehurst, T. F., and B. M. Lund. 1990. The influence of pH, temperature and organic acids on the initiation of growth of *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 69: 390~397.

[21] Bryan, F. L. 1979. Infections and intoxications caused by other bacteria. In *Foodborne Infections and Intoxications*, ed. H. Riemann and F. L. Bryan, 211~297. New York: Academic Press.

[22] Buchrieser, C., V. V. Gangar, R. L. Murphree, M. L. Tamplin, and C. W. Kaspar. 1995. Multiple *Vibrio vulnificus* strains in oysters as demonstrated by clamped homogeneous electric field gel electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 1163~1168.

[23] Calia, K. E., M. Murtagh, M. J. Ferraro, and S. B. Calderwood. 1994. Comparison of *Vibrio cholerae* O139 with *V. cholerae* 01 classical and El Tor biotypes. *Infect. Immun.* 62: 1504~1506.

[24] Carter, P. B., R. J. Zahorchak, and R. R. Brubaker. 1980. Plague virulence antigens from *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 28: 638~640.

[25] Centers for Disease Control. 1990. *Yersinia enterocolitica* infections during the holidays in black families- Georgia. *Morb. Mort. Wkly. Rept.* 39: 819~821.

[26] Centers for Disease Control. 1989. Toxigenic *Vibrio cholerae* 01 infection acquired in Colorado. *Morb. Mort. Wkly. Rept.* 38: 19~20.

[27] Centers for Disease Control. 1993. Isolation of *Vibrio cholerae* 01 from oysters—Mobile Bay, 1991—1992. *Morb. Mort. Wkly. Rept.* 42: 91~93.

[28] Centers for Disease Control. 1993. *Vibrio vulnificus* infections associated with raw oyster consumption Florida, 1981—1992. *Morb. Mort. Wkly. Rept.* 42: 405~407.

[29] Chan, K.-Y., M. L. Woo, L. Y. Lam, and G. L. French. 1989. *Vibrio parahaemolyticus* and other halophilic vibrios associated with seafood in Hong Kong. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 57~64.

[30] Cherwonogrodzky, J. W., and A. G. Clark. 1981. Effect of pH on the production of the Kanagawa hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 34: 115~119.

[31] Corrales, M. T., A. E. Bainotti, and A. C. Simonetta. 1994. Survival, of *Vibrio cholerae* 01 in common foodstuffs during storage at different temperatures. *Lett. Appl. Microbiol.* 18: 277~280.

[32] DePaola, A., M. W. Presnell, R. E. Becker, M. L. Motes, Jr., S. R. Zywno, J. F. Musselman, J. Taylor, and L. Williams. 1984. Distribution of *Vibrio cholerae* in the Apalachicola (Florida) Bay estuary. *J. Food Protect.* 47: 549~553.

[33] Doyle, M. P. 1984. Association of *Campylobacter jejuni* with laying hens and eggs. Appl. Environ. Microbiol. 47: 533~536.

[34] Doyle, M. P., M. B. Hugdahl, and S. L. Taylor. 1981. Isolation of virulent *Yersinia enterocolitica*

from porcine tongues. *Appl. Environ. Microbiol.* 42: 661～666.

[35] Doyle, M. P., and D. J. Roman. 1982. Prevalence and survival of *Campylobacter jejuni* in unpasteurized milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1154～1158.

[36] Faghri, M. A., C. L. Pennington, L. B. Cronholm, and R. M. Atlas. 1984. Bacteria associated with crabs from cold waters, with emphasis on the occurrence of potential human pathogens. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1054～1061.

[37] Francis, D. W., P. L. Spaulding, and J. Lovett. 1980. Enterotoxin production and thermal resistance of *Yersinia enterocolitica* in milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 174～176.

[38] Fujino, T., G. Sakaguchi, R. Sakazaki, and Y. Takeda. 1974. *International Symposium on* Vibrio parahaemolyticus. Tokyo: Saikon.

[39] Gill, C. O., and L. M. Harris. 1984. Hamburgers and broiler chickens as potential sources of human *Campylobacter* enteritis. *J. Food Protect.* 47: 96～99.

[40] Guerry, P., and R. R. Colwell. 1977. Isolation of cryptic plasmid deoxyribonucleic acid from Kanagawa-positive strains of *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 16: 328～334.

[41] Gutman, L. T., E. A. Ottesen, T. J. Quan, P. S. Noce, and S. L. Katz. 1973. An interfamilial outbreak of *Yersinia enterocolitica* enteritis. *N. Engl. J. Med.* 288: 1372～1377.

[42] Hanna, M. O., J. C. Stewart, Z. L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1977. Heat resistance of *Yersinia enterocolitica* in skim milk. *J. Food Sci.* 42: 1134, 1136.

[43] Hanna, M. O., J. C. Stewart, D. L. Zink, Z. L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1977. Development of *Yersinia enterocolitica* on raw and cooked beef and pork at different temperatures. *J. Food Sci.* 42: 1180～1184.

[44] Hanna, M. O., D. L. Zink, Z. L. Carpenter, and C. Vanderzant. 1976. *Yersinia enterocolitica*-like organisms from vacuum-packaged beef and lamb. *J. Food Sci.* 41: 1254～1256.

[45] Hanski, C., M. Naumann, A. Grutzkau, G. Pluschke, B. Friedrich, H. Hahn, and E. O. Riecken. 1991. Humoral and cellular defense against intestinal murine infection with *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 59: 1106～1111.

[46] Harmon, M. C., B. Swaminathan, and J. C. Forrest. 1984. Isolation of *Yersinia enterocolitica* and related species from porcine samples obtained from an abattoir. *J. Appl. Bacteriol.* 56: 421～427.

[47] Highsmith, A. K., J. C. Feeley, and G. K. Morris. 1977. *Yersinia enterocolitica*: A review of the bacterium and recommended laboratory methodology. *Hlth. Lab. Sci.* 14: 253～260.

[48] Honda, T., K. Goshima, Y. Takeda, Y. Sugino, and T. Miwatani. 1976. Demonstration of the cardiotoxicity of the thermostable direct hemolysin (lethal toxin) produced by *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect. Immun.* 13: 163～171.

[49] Hughes, D., and N. Jensen. 1981. *Yersinia enterocolitica* in raw goat's milk. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 309～310.

[50] Hughes, J. M., D. G. Hollis, E. J. Gangarosa, and R. E. Weaver. 1978. Noncholera vibrio infections in the United States: Clinical, epidemiologic and laboratory features. *Ann. Intern. Med.* 88: 602～606.

[51] Hunt, M. D., W. E. Woodard, B. H. Keswick, and H. L. Dupont. 1988. Seroepidemiology of cholera in Gulf coastal Texas. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1673～1677.

[52] Islam, M. S., M. K. Hasan, M. A. Miah, M. Yunus, K. Zaman, and M. J. Albert. 1994.

Isolation of *Vibrio cholerae* 0139 synonym Bengal from the aquatic environment in Bangladesh: Implications for disease transmission. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1684～1686.

[53] Kaikoku, T., M. Kawaguchi, K. Takama, and S. Suzuki. 1990. Partial purification and characterization of the enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 58: 2414～2419.

[54] Kaneko, T., and R. R. Colwell. 1973. Ecology of *Vibrio parahaemolyticus* in Chesapeake Bay. *J. Bacteriol.* 113: 24～32.

[55] Kaper, J., H. Lockman, R. R. Colwell, and S. W. Joseph. 1979. Ecology, serology, and enterotoxin production of *Vibrio cholerae* in Chesapeake Bay. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 91～103.

[56] Karaolis, D. K. R., R. Lan, and P. R. Reeves. 1995. The sixth and seventh cholera pandemics are due to independent clones separately derived from environmental, nontoxigenic, non01 *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* 177: 3191～3198.

[57] Karunsagar, I. 1981. Production of hemolysin by *Vibrio parahaemolyticus* in a chemically defined medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 1274～1275.

[58] Karunsagar, I., S. W. Joseph, R. M. Twedt, H. Hada, and R. R. Colwell. 1984. Enhancement of *Vibrio parahaemolyticus* virulence by lysed erythrocyte factor and iron. *Infect. Immun.* 46: 141～144.

[59] Kasrazedeh, M., and C. Genigeorgis. 1987. Origin and prevalence of *Campylobacter jejuni* in ducks and duck meat at the farm and processing plant level. *J. Food Protect.* 50: 321～326.

[60] Kelly, M. T., and E. M. Dan Stroh. 1989. Urease-positive, Kanagawa-negative *Vibrio parahaemolyticus* from patients and the environment in the Pacific Northwest. *J. Clin. Microbiol.* 27: 2820～2822.

[61] Kenyon, J. E., D. R. Piexoto, B. Austin, and D. C. Gillies. 1984. Seasonal variation in numbers of *Vibrio cholerae* (non-01) isolated from California coastal waters. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1243～1245.

[62] Klipstein, F. A., and R. F. Engert. 1984. Properties of crude *Campylobacter jejuni* heatlabile enterotoxin. *Infect. Immun.* 45: 314～319.

[63] Klipstein, F. A., and R. F. Engert. 1985. Immunological relationship of the B subunits of *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli* heat-labile enterotoxins. *Infect. Immun.* 48: 629～633.

[64] Kothary, M. H., and S. H. Richardson. 1987. Fluid accumulation in infant mice caused by *Vibrio hollisae* and its extracellular enterotoxin. *Infect. Immun.* 55: 626～630.

[65] Laird, W. J., and D. C. Cavanaugh. 1980. Correlation of auto-agglutination and virulence of yersiniae. *J. Clin. Microbiol.* 11: 430～432.

[66] Lee, W. H., R. E. Smith, J. M. Damare, M. E. Harris, and R. W. Johnston. 1981. Evaluation of virulence test procedures for *Yersinia enterocolitica* recovered from foods. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 529～539.

[67] Leistner, L., H. Hechelmann, and R. Albert. 1975. Nachweis von *Yersinia enterocolitica* in Faeces und Fleisch von Schweinen, Hindern und Geflugel. *Fleischwirtschaft* 55: 1599～1602.

[68] Lindblom, G. -B., B. Kaijser, and E. Sjogren. 1989. Enterotoxin production and serogroups of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* from patients with diarrhea and from healthy laying hens. *J. Clin. Microbiol.* 27: 1272～1276.

[69] Liston, J. 1973. *Vibrio parahaemolyticus*. In *Microbial Safety of Fishery Products*, ed. C. O.

Chichester and H. D. Graham, 203 213. New York: Academic Press.

[70] Manninen, K. I., J. F. Prescott, and I. R. Dohoo. 1982. Pathogenicity of *Campylobacter jejuni* isolates from animals and humans. *Infect. Immun.* 38: 46～52.

[71] Martinez, R. J. 1983. Plasmid-mediated and temperature-regulated surface properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 11: 921～930.

[72] Matte, G. R., M. H. Matté, I. G. Rivera, and M. T. Martins. 1994. Distribution of potentially pathogenic vibrios in oysters from a tropical region. *J. Food Protect.* 57: 870～873.

[73] McCardell, B. A., J. M. Madden, and E. C. Lee. 1984. *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* production of a cytotonic toxin immunologically similar to cholera toxin. *J. Food Protect.* 47: 943～949.

[74] Miliotis, M. D., B. D. Tall, and R. T. Gray. 1995. Adherence to an invasion of tissue culture cells by *Vibrio hollisae*. *Infect. Immun.* 63: 4959～4963.

[75] Molenda, J. R., W. G. Johnson, M. Fishbein, B. Wentz. I. J. Mehlman, and T. A. Dadisman, Jr. 1972. *Vibrio parahaemolyticus* gastroenteritis in Maryland: Laboratory aspects. *Appl. Microbiol.* 24: 444～448.

[76] Morris, J. G., R. Wilson, B. R. Davis, I. K. Wachsmuth, C. F. Riddle, H. G. Wathen, R. A. Pollard, and P. A. Blake. 1981. Non-0 group 1 *Vibrio cholerae* gastroenteritis in the United States. *Ann. Intern. Med.* 94: 656～658.

[77] Mors, V., and C. H. Pai. 1980. Pathogenic properties of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 28: 292～294.

[78] Moustafa, M. K., A. A. -H. Ahmed, and E. H. Marth. 1983. Occurrence of *Yersinia enterocolitica* in raw and pasteurized milk. *J. Food Protect.* 46: 276～278.

[79] Murphree, R. L., and M. L. Tamplin. 1991. Uptake and retention of *Vibrio cholerae* 01 in the Eastern oyster, *Crassostrea virginica*. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3656～3660.

[80] Nakasone, N., and M. Iwanaga. 1990. Pili of *Vibrio parahaemolyticus* strain as a possible colonization factor. *Infect. Immun.* 58: 61～69.

[81] National Advisory Committee on Microbiological Criteria for Foods. 1994. *Campylobacter jejuni/coli*. *J. Food Protect.* 57: 1101～1121.

[82] Nishibuchi, M., S. Doke, S. Toizumi, T. Umeda, M. Yoh, and T. Miwatani. 1988. Isolation from a coastal fish of *Vibrio hollisae* capable of producing a hemolysin similar to the thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 2141～2146.

[83] Nishibuchi, M., M. Ishibashi, Y. Takeda, and J. B. Kaper. 1985. Detection of the thermostable direct hemolysin gene and related DNA sequences in *Vibrio parahaemolyticus* and other *Vibrio* species by the DNA colony hybridization test. *Infect. Immun.* 49: 481～486.

[84] Nishibuchi, M., and J. B. Kaper. 1985. Nucleotide sequence of the thermostable direct hemolysin gene of *Vibrio parahaemolyticus*. *J. Bacteriol.* 162: 558～564.

[85] Ogawa, A., J. -I. Kato, H. Watanabe, B. G. Nair, and T. Takeda. 1990. Cloning and nucleotide sequence of a heat-stable enterotoxin gene from *Vibrio cholerae* non-01 isolated from a patient with traveler's diarrhea. *Infect Immun.* 58: 3325～3329.

[86] Ogg, J. E., R. A. Ryder, and H. L. Smith, Jr. 1989. Isolation of *Vibrio cholerae* from aquatic birds in Colorado and Utah. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 95～99.

[87] Okamoto, K., T. Inoue, H. Ichikawa, Y. Kawamoto, and A. Miyama. 1981. Partial purification

and characterization of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 31: 554～559.

[88] Okamoto, K., T. Inoue, K. Shimizu, S. Hara, and A. Miyama. 1982. Further purification and characterization of heat-stable enterotoxin produced by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35: 958～964.

[89] Pace, J., and T. J. Chai. 1989. Comparison of *Vibrio parahaemolyticus* grown in estuarine water and rich medium. *Appl. Environ. Microbiol.* 55: 1877～1887.

[90] Paerregaard, A., F. Espersen, O. M. Jensen, and M. Skurnik. 1991. Interactions between *Yersinia enterocolitica* and rabbit ileal mucus: Growth, adhesion, penetration, and subsequent changes in surface hydrophobicity and ability to adhere to ileal brush border membrane vesicles. *Infect. Immun.* 59: 253～260.

[91] Pai, C. H., and L. DeStephano. 1982. Serum resistance associated with virulence in *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35: 605～611.

[92] Pai, C. H., and V. Mors. 1978. Production of enterotoxin by *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 119: 908～911.

[93] Pai, C. H., V. Mors, and S. Toma. 1978. Prevalence of enterotoxigenicity in human and nonhuman isolates of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 22: 334～338.

[94] Pierson, D. E., and S. Falkow. 1990. Nonpathogenic isolates of *Yersinia enterocolitica* do not contain functional *inv*-homologous sequences. *Infect. Immun.* 58: 1059～1064.

[95] Popovic, T., P. I. Fields, O. Olsvik, J. G. Wells, G. M. Evins, D. N. Cameron, J. J. Farmer Ⅲ, C. A. Bopp, K. Wachsmuth, R. B. Sack, M. J. Albert, G. B. Nair, T. Shimada, and J. C. Feeley. 1995. Molecular subtyping of toxigenic *Vibrio cholerae* 0139 causing epidemic cholera in India and Bangladesh, 1992 · 1993. *J. Infect. Dis.* 171: 122～127.

[96] Portnoy, D. A., and S. Falkow. 1981. Virulence-associated plasmids from *Yersinia enterocolitica* and *Yersinia pestis*. *J. Bacteriol.* 148: 877～883.

[97] Prpic, J. K., R. M. Robins-Browne, and R. B. Davey. 1985. In vitro assessment of virulence in *Yersinia enterocolitica* and related species. *J. Clin. Microbiol.* 22: 105～110.

[98] Reynolds, G. N., and F. A. Draughon. 1987. *Campylobacter jejuni* in vacuum packaged processed turkey. *J. Food Protect.* 50: 300～304.

[99] Rippey, S. R. 1994. Infectious diseases associated with molluscan shellfish consumption. *Clin. Microbiol. Rev.* 7: 419～425.

[100] Robins-Browne, R. M., and J. K. Prpic. 1985. Effects of iron and desferrioxamine on infections with *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 47: 774～779.

[101] Robins-Browne, R. M., C. S. Still, M. D. Miliotis, and H. J. Koornhof. 1979. Mechanism of action of *Yersinia enterocolitica* enterotoxin. *Infect. Immun.* 25: 680～684.

[102] Ruiz-Palacios, G. M., J. Torres, E. Escamilla, B. R. Ruiz-Palacios, and J. Tamayo. 1983. Cholera-like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. *Lancet* 2: 250～253.

[103] Russell, R. G., and D. C. Blake, Jr. 1994. Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect. Immun.* 62: 3773～3779.

[104] Sakazaki, R. 1979. *Vibrio* infections. In *Food-borne Infections and Intoxications*, ed. H. Riemann and F. L. Bryan, 173～209. New York: Academic Press.

[105] Sakazaki, R. 1983. *Vibrio parahaemolyticus* as a food-spoilage organism. In *Food Microbiology*,

ed. A. H. Rose, 225～241. New York: Academic Press.

[106] Schiemann, D. A. 1981. An enterotoxin-negative strain of *Yersinia enterocolitica* serotype O: 3 is capable of producing diarrhea in mice. *Infect. Immun.* 32: 571～574.

[107] Schiemann, D. A., and J. A. Devenish. 1982. Relationship of HeLa cell infectivity to biochemical, serological, and virulence characteristics of *Yersinia enterocolitica*. *Infect. Immun.* 35: 497～506.

[108] Shanker, S., J. A. Rosenfield, G. R. Davey, and T. C. Sorrell. 1982. *Campylobacter jejuni*: Incidence in processed broilers and biotype distribution in human and broiler isolates. *Appl. Environ. Microbiol.* 43: 1219～1220.

[109] Shayegani, M., L. Deforge, D. M. McGlynn, and T. Root. 1981. Characteristics of *Yersinia enterocolitica* and related species isolated from human, animal and environmental sources. *J. Clin. Microbiol.* 14: 304～312.

[110] Shirai, H., H. Ito, T. Hirayama, Y. Nakamoto, N. Nakabayashi, K. Kumagai, Y. Takeda, and M. Nishibuchi. 1990. Molecular epidemiologic evidence for association of thermostable direct hemolysin (TDH) and TDH related hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus* with gastroenteritis. *Infect. Immun.* 58: 3568～3573.

[111] Smith, J. L. 1995. Arthritis, Gullain-Barre syndrome, and other sequelae of *Campylobacter jejuni* enteritis. *J. Food Protect.* 58: 1153～1170.

[112] Smitherman, R. E., C. A. Genigeorgis, and T. B. Farver. 1984. Preliminary observations on the occurrence of *Campylobacter jejuni* at four California chicken ranches. *J. Food Protect.* 47: 293～298.

[113] Sperandio, V., J. A. Girón, W. D. Silveira, and J. B. Kaper. 1995. The OmpU outer membrane protein, a potential adherence factor of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 63: 4433～4438.

[114] Stelma, G. N., Jr., P. L. Spaulding, A. L. Reyes, and C. H. Johnson. 1988. Production of enterotoxin by *Vibrio vulnificus* isolates. *J. Food Protect.* 51: 192～196.

[115] Stern, N. J., and J. M. Damare. 1982. Comparison of selected *Yersinia enterocolitica* indicator tests for potential virulence. *J. Food Sci.* 47: 582～588.

[116] Stern, N. J., S. S. Green, N. Thaker, D. J. Krout, and J. Chiu. 1984. Recovery of *Campylobacter jejuni* from fresh and frozen meat and poultry collected at slaughter. *J. Food Protect.* 47: 372～374.

[117] Stern, N. J., M. P. Hernandez, L. Blankenship, K. E. Deibel, S. Doores, M. P. Doyle, H. Ng, M. D. Pierson, J. N. Sofos, W. H. Sveum, and D. C. Westhoff. 1985. Prevalence and distribution of *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* in retail meats. *J. Food Protect.* 48: 595～599.

[118] Stern, N. J., and A. W. Kotula. 1982. Survival of *Campylobacter jejuni* inoculated into ground beef. *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 1150～1153.

[119] Stern, N. J., M. D. Pierson, and A. W. Kotula. 1980. Effects of pH and sodium chloride on *Yersinia enterocolitica* growth at room and refrigeration temperatures. *J. Food Sci.* 45: 64～67.

[120] Sun, Y., and J. D. Oliver. 1995. Hot sauce: No elimination of *Vibrio vulnificus* in oysters. *J. Food Protect.* 58: 441～442.

[121] Sun, Y., and J. D. Oliver. 1994. Effects of GRAS compounds on natural *vibrio vulnificus* populations in oysters. *J. Food Protect.* 57: 921～923.

[122] Swaminathan, B., M. C. Harmon, and I. J. Mehlman. 1982. *Yersinia enterocolitica*. *J. Appl. Bacteriol.* 52: 151～183.

[123] Takeda, T., G. B. Nair, K. Suzuki, and Y. Shimonishi. 1990. Production of a monoclonal antibody to *Vibrio cholerae* non-01 heat-stable enterotoxin (ST) which is cross-reactive with *Yersinia enterocolitica* ST. *Infect. Immun.* 58: 2755～2759.

[124] Takeda, Y. 1983. Thermostable direct hemolysin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Pharm. Ther.* 19: 123～146.

[125] Tibana, A., M. B. Warnken, M. P. Nunes, I. D. Ricciardi, and A. L. S. Noleto. 1987. Occurrence of *Yersinia* species in raw and pasteurized milk in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protect.* 50: 580～583.

[126] Toma, S., and L. Lafleur. 1974. Survey on the incidence of *Yersinia enterocolitica* infection in Canada. *Appl. Microbiol.* 28: 469～473.

[127] Twedt, R. M., J. T. Peeler, and P. L. Spaulding. 1980. Effective ileal loop dose of Kanagawapositive *Vibrio parahaemolyticus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1012～1016.

[128] Twedt, R. M., P. L. Spaulding, and H. E. Hall. 1969. Morphological, cultural, biochemical, and serological comparison of Japanese strains of *Vibrio parahaemolyticus* with related cultures isolated in the United States. *J. Bacteriol.* 98: 511～518.

[129] Vanderzant, C., and R. Nickelson. 1972. Survival of *Vibrio paraemolyticus* in shrimp tissue under various environmental conditions. *Appl. Microbiol.* 23: 34～37.

[130] Vidon, D. J. M., and C. L. Delmas. 1981. Incidence of *Yersinia enterocolitica* in raw milk in Eastern France. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 353～359.

[131] Walker, S. J., and A. Gilmour. 1990. Production of enterotoxin by *Yersinia* species isolated from milk. *J. Food Protect.* 53: 751～754.

[132] Warnken, M. B., M. P. Nunes, and A. L. S. Noleto. 1987. Incidence of *Yersinia species* in meat samples purchased in Rio de Janeiro, Brazil. *J. Food Protect.* 50: 578～579, 583.

[133] Wright, A. C., and J. G. Morris, Jr. 1991. The extracellular cytolysin of *Vibrio vulnificus*: Inactivation and relationship to virulence in mice. *Infect. Immun.* 59: 192～197.

[134] Yamamoto, K., Y. Ichinose, H. Shinagawa, K. Makino, A. Nakata, M. Iwanaga, T. Honda, and T. Miwatani. 1990. Two step processing for activation of the cytolysin/hemolysin of *Vibrio cholerae* 01 biotype El Tor: Nucleotide sequence of the structural gene (*hlyA*) and characterization of the processed products. *Infect. Immun.* 58: 4106～4116.

[135] Yamamoto, K., A. C. Wright, J. B. Kaper, and J. G. Morris, Jr. 1990. The cytolysin gene of *Vibrio vulnificus*: Sequence and relationships to the *Vibrio cholerae* El Tor hemolysin gene. *Infect. Immun.* 58: 2706～2709.

[136] Yamamoto, T., and T. Yokota. 1989. Adherence targets of *Vibrio parahaemolyticus* in human small intestines. *Infect. Immun.* 57: 2410～2119.

[137] Yuki, N., T. Taki, M. Takahashi, K. Saito, T. Tai, T. Miyatake, and S. Hando. 1994. Penner's serotype 1 of *Campylobacter jejuni* has a lipopolysaccharide that bears a GM1 ganglioside epitope as well as one that bears a GD1a epitope. *Infect. Immun.* 62: 2101～2103.

[138] Zen-Yoji, H., Y. Kudoh, H. Igarashi, K. Ohta, and K. Fukai. 1975. Further studies on characterization and biological activities of an enteropathogenic toxin of *Vibrio parahaemolyticus*. *Toxicon* 13: 134～135.

26. 食品中的动物寄生虫

可以通过某些食物摄入的动物寄生虫属于三个特定的组：原生动物、扁形虫和圆形虫。这些组中的与人类食物有关的一些重要的成员以及它们的分类将在本部分讨论。

与食品中的细菌相比，动物寄生虫不会在食品中繁殖，它们的存在必须用直接方法测定，因为它们在培养基中不能生长。因为所有这些寄生虫的形体都比细菌大，所以采用适当的浓缩与染色方法可以相当容易地检测到。由于许多寄生虫是细胞内的病原虫，所以细胞对这些寄生虫病的抗性与对李斯特菌病抗性的现象类似（参阅第七部分 22）。某些动物寄生虫最后一个有意义的与细菌不同的特性是它们需要两种以上的寄主来完成它们的生命循环。这些寄生虫的成虫在终端寄主中完成它们的有性生命循环，而幼虫（或幼龄形式）在中间寄主中进行幼龄期的生长。在某些情况下，只有一个终端寄主（例如隐孢子虫病），而在另一些情况下，终端寄主有可能不止一种（例如裂头绦虫病）；另外也有幼虫和成虫的发育阶段均在同一个寄主体内（例如旋毛虫病）。

26.1 原生动物

原生动物属于原生生物界，原生生物界也包括藻类和有鞭毛真菌。它们是形体最小的、最原始的动物形式，其中与食物有关的 5 个属的分类如下：

原生生物界（Protista）
- 肉鞭毛虫门（Sarcomastigophora）
 - 动鞭毛纲（Zoomastigophorea）
 - 双滴虫目（Diplomonadida）
 - 六鞭虫科（Hexamitidae）
 - 贾第鞭毛虫属（*Giardia*）

肉足亚门（Sarcodina）
- 根足总纲（Rhizopoda）
 - 叶足纲（Lobosea）
 - 阿米巴目（Amoebida）
 - 内阿米巴科（Endamoebidae）
 - 内阿米巴科属（*Entamoeba*）

顶复亚门（Apicomplexa）＝孢子虫亚门（Sporozoa）
- 孢子虫纲（Sporozoea）
 - 真球虫目（Eucoccidiida）
 - 内孢子虫科（Sarcocystidae）
 - 弓形虫属（*Toxoplasma*）
 - 内孢子虫属（*Sarcocystis*）
 - 隐孢子虫科（*Cryptosporidiidae*）

隐孢子虫属 (*Cryptosporidium*)

26.1.1 贾第鞭毛虫病

兰氏贾第鞭毛虫 (*Giardia lamblia*) 是一种有鞭毛的原生动物，它们以比溶组织内阿米巴虫 (*Entamoeba histolytica*) 数量多的水平存在于水域环境中。这种原生动物的细胞 (滋养体) 能产生囊胞．这种囊胞是存在于水和食品中的主要形式。它的形状呈梨形，其大小为：长 8～20μm，宽 5～12μm。这种滋养体具有 8 根鞭毛，着生在靠近成对核子的腰部两侧，使得囊胞具有“落叶状”运动能力。

被摄入体内之后，贾第鞭毛虫的泡囊在胃酸和蛋白酶的作用下在胃肠道中脱囊，变成有临床活性的贾第鞭毛虫病。这种幼虫的脱囊作用可能发生在小肠上端，这一步骤可以被看作是一种毒性发作[8]。这种幼虫没有活跃的吞噬能力，它们靠吸收作用获得营养。在有些场合，它们可以侵入胆管，导致胆管炎。与其它寄生于肠道的原生动物相比，贾第鞭毛虫幼虫并不会穿透胃肠道组织。

26.1.1.1 环境分布

水源是贾第鞭毛虫病第二个最常见的来源。第一起有纪录的贾第鞭毛虫病流行事件于 1965 年发生在美国科罗拉多州的阿斯本滑雪场，涉及患病人数有 123 人[17]。在 1965—1977 年间，水源导致的发病事件达到了 23 起，涉及患病的有 7000 人[18]。在 1971—1985 年间，美国有报道的发病事件为 92 起[17]。贾第鞭毛虫泡囊对水源中正常添加的含氯水平具有耐受性。在水中，海狸和麝鼠是这种寄生虫的主要来源。在新泽西州西南部自然水域中采集的 220 份麝鼠粪便样品中，有 70%含有贾第鞭毛虫泡囊[45]。据估计，美国约有 15%的人受到过这种寄生虫的感染。

26.1.1.2 症状、诊断与治疗

贾第鞭毛虫病临床的潜伏期为 7～13d，它的泡囊会在 3～4 周后出现在患者的粪便中。无症状通过人体是兰氏贾第鞭毛虫感染最良性的表现，但是当临床贾第鞭毛虫病发病时，它的症状会延续几个月至 1 年以上。患者每天排出的泡囊可达 9.0×10^6，它们在下水道中可以存活长达 3 个月[8]。兰氏贾第鞭毛虫一般不具有入侵性，人在不慎摄入这种虫之后常常伴有一些发病的症状[73]。当十二指肠和回肠上部的胆汁含量升高时对这种虫的生长有利[61]。

1976 年发生在美洲马德拉岛的一起贾第鞭毛虫病流行事件中，有 1400 人患病，患者出现的症状 (比例) 如下：腹绞痛 (75%)、腹部膨胀 (72%)、恶心 (70%)、体重下降 (40%)。平均的潜伏时间为 4d，在 58 名患者的粪便中有 47%检测出了兰氏贾第鞭毛虫。饮用自来水和食用冰淇淋或生蔬菜显然与这种病的发生有关[52]。在 1979—1980 年间由于食用了家制的大麻哈鱼罐头而得病的 29 名患者出现了下述症状：腹泻 (100%)、疲劳乏力 (97%)、腹绞痛 (83%)、发热 (21%)、呕吐 (17%)、体重下降 (59%)[59]。在另一份对 183 名患者的研究中，发现主要的 5 种症状及比例如下：腹泻 (92%)、腹绞痛 (70%)、恶心 (58%)、发热 (28%)、呕吐 (23%)[73]。患贾第鞭毛虫病后体重一般下降 2.27kg 左右，1985 年发生的一起这种病的流行事件还与面条色拉有关[60]。

贾第鞭毛虫病是一种高度传染性的疾病。它被证实曾经在卫生条件不良的午餐服务

中心传播。人群的感染比例为2.4%～67.5%[1-4]。人体的最低感染剂量为10个或10个以下兰氏贾第鞭毛虫泡囊[5-7]。

贾第鞭毛虫病的确诊只要证实粪便样品中有它的幼虫存在，检验方法是在显微镜下观察它的湿标本或染色标本。兰氏贾第鞭毛虫可以在无菌培养的条件下生长，但是这种方法不能用于快速诊断。ELISA试验是一种高效的检测方法，在兰氏贾第鞭毛虫感染过程中可以诱导循环抗体和T-淋巴细胞的生成。由于没有证实有肠毒素产生，所以腹泻是由于其它因素造成的[73]。治疗贾第鞭毛虫病可选的药有阿的平（quinacrine），这是一种吖啶衍生物。对这种病有效的药还有甲硝唑（metronidazole）和替硝唑（tinidazole）[13]。

26.1.1.3 在食品中的发生率与病例

贾第鞭毛虫出现在某些蔬菜中，可以推测这种鞭毛虫可能出现在用污染的水洗过的食品上或被无症状带菌者污染的食品上。1968年在意大利罗马检测的64根莴苣上，有48根含有贾第鞭毛虫幼虫，1981年在波兰也从草莓上发现了这种虫的泡囊[37]。

早在1928年，有人指出医院的食品加工人员可能是病人感染原生动物的来源。在一家城市中心医院的844名病人中，有36%感染了贾第鞭毛虫病，据认为这些感染是由于食用了含有泡囊的生水果和蔬菜引起的。Barnard和Jackson[31]描述了这些感染和某些早期发生的其它可能起因于食品的贾第鞭毛虫病病例。下面是一些可能起因于食品和已证实起因于食品的贾第鞭毛虫病：

①1960年，一个家庭中4名成员中有3人食用了被怀疑是鼠粪污染了的圣诞节布丁后患病，粪便中发现了贾第鞭毛虫似的泡囊[16]。

②1968—1969年间，Gangaroso和Donadio[30]在食品起因疾病的监督过程中纪录了19起贾第鞭毛虫病流行事件，涉及患病人数1969人，但没有提供详细的资料。

③在1976年，约有1400名美国人在马德拉岛感染了贾第鞭毛虫病。自来水、冰淇淋和生蔬菜是可能的根源[1,2]。

④在1979年12月，美国明尼苏达州当地社团组织中的60名雇员中有29人在食用了家制沙丁鱼罐头以后被感染，而制备这种罐头的人在更换婴儿尿布后感染了一种无致病症状贾第鞭毛虫[59]。

⑤在1985年7月，16名参加野餐聚会的人中有13人感染了有症状的贾第鞭毛虫病，其中最有可能的载毒食品是一种面条沙拉[60]。虽然多数患者在聚会后6～20d内出现了症状，这种沙拉的制作者在沙拉被别人食用1d之后就出现发病症状。这是第二起有详细记载的追溯到食品来源的感染事件。

⑥在1988年，新墨西哥阿尔布凯克一个教堂中年轻会组的108名成员中有21人患病。教堂午餐中的炸玉米卷配料是最为可能的含虫载体[12]。

美国疾病控制中心（CDC）记载了1985—1986年间贾第鞭毛虫病流行事件，1985年发生了1起流行事件，涉及患病的有13人；1986年有2起流行事件，其中28人患病[5]。这种寄生虫病的普遍发生现象表明，实际来自食品的感染可能要比有记载的事件频繁的多。这种感染的潜伏期可达7d以上，这可能是被报道数最较少的原因之一。报道较少的另一个原因是需要用镜检方法证实病原体在粪便和残剩食品中的存在，这样的微生物检验方法在食物中毒胃肠炎的食品检验中是不常见的。

26.1.2 阿米巴虫病

阿米巴虫病（阿米巴痢疾）是由溶组织内阿米巴（*Entamoeba histolytica*）引起的，它常常通过粪便—口入途径传播，但是通过水源、食品加工者和食品的传播也是常见的。根据 Jackson[35]的分析，有更多的记载表明通过食品传播的阿米巴痢疾比其它肠道原生动物疾病都多。这种微生物的独特之处在于它是厌氧的，它的幼虫（阿米巴阶段）缺少线粒体。它是耐氧的厌氧生物，需要葡萄糖或半乳糖作为主要的呼吸底物[55]。溶组织内阿米巴幼虫的大小为 10～60μm，而它的泡囊一般为 10～20μm。它的幼虫能够运动，但泡囊不能运动。它常常与大肠杆菌一起被发现，两者经常一起出现在肠道与粪便中。在痢疾急性发病阶段的热粪便中，溶组织内阿米巴可以活跃地运动，这时它们一般还包藏有血红细胞，而这些血红细胞是由这种原生动物的假突摄入的。虽然它的数量在粪便中没有大肠杆菌多，但后者不会摄入血红细胞。虽然阿米巴的幼虫不能在自然环境中生存，但它的被包埋形式可以在下水道中存活 3 个月之久[3]。患这种病的患者每天粪便中可能排出 4.5×10^7 个泡囊[4]。

如果病员休息室的卫生条件不好，泡囊进入食品的潜在途径就可能成为现实途径。阿米巴虫病的发生率变化很大，所报道的在美国华盛顿州塔科马港的发生率为 1.4%，而在田纳西州乡村的发生率为 36.4%[14]。据估计世界上有 10%的人感染过溶组织内阿米巴，每年有 100 万人患阿米巴肠炎或肝囊肿。

在幼虫阶段，溶组织内阿米巴能导致肠黏膜细胞囊肿和结肠溃疡。它可以在一种半乳糖专一性凝集素的协助下黏附到寄主细胞的糖蛋白上。它在大肠中进行二分分裂，在回肠内被包埋在泡囊内，在肠腔内也可能游离出来。这种微生物能够产生一种相对分子质量为 35000～45000 的肠毒素蛋白[11]。

症状、诊断与治疗：阿米巴虫病的潜伏期为 2～4 周，发病的症状可以延续几个月。这种病的开始阶段常常是很隐蔽的，一般呈现粪便较稀，但一般不发热。患者的特征症状为粪便中有黏液和血液。后来的症状有明显的腹痛、发热、严重腹泻、呕吐和腰痛，其症状有点类似于志贺氏菌病。体重下降是普遍的结果，所有的患者粪便都呈血红素阳性。根据 Jackson[35]报道，爆发性的阿米巴虫病有 6%～11%患者带有结肠溃疡和中毒症状，尤其是怀孕和哺乳期的妇女。阿米巴及其黏液可能积聚在回肠内，导致肠道阻塞。在某些患者体内，阿米巴虫病可能会延续几年，而贾第鞭毛虫病的延续时间很少超过 3 个月[5]。在某些情况下，阿米巴虫病可能是在一些肠道细菌的诱发下发病的。

阿米巴虫病方法是检测幼虫和泡囊在粪便中或刮出的黏液中是否存在。免疫学方法，例如间接凝血试验、间接荧光免疫试验、乳汁凝集试验和 ELISA 试验对诊断也是有帮助的。这些试验对于肠道外的阿米巴虫病的灵敏度较高，采用间接凝血试验方法检验时，只要 1 滴 1∶64 的样品就足够了。

这种病症可以用抗阿米巴的药物（甲硝唑和氯喹）进行治疗。细胞免疫方法可以增强对这种病的抵抗力。患者的淋巴细胞在溶组织内阿米巴抗原的存在下可能会产生 γ-干扰素，这种干扰素能激活巨噬细胞，从而显示出对阿米巴虫的免疫能力[69]。

26.1.3 弓形体病

这种疾病是由鼠弓形体（*Toxoplasma gondii*）引起的。鼠弓形体是一种专门寄生于细胞内的球形原生动物。原生动物的一般名称是根据它们在阿米巴阶段的特征形状来命名的，例如球形、列队形和弓形等。鼠弓形体最早是1908年从一种非洲的啮齿动物-供地鼠中被分离出来的，因此获得了种名。在多数场合下，人摄入鼠弓形体卵囊后并不会出现症状，或者感染是“自身限制性”的。在这些情况下，它们被包埋起来，成为潜伏性生物。但是，当它们失去免疫竞争状态之后，潜伏的感染就会爆发（复发）成为危及生命的弓形体病。

家养或野生的猫是鼠弓形体有性阶段主要的终端寄主，从而也是人感染弓形体病的主要来源。在通常情况下，这种病只是由猫传染给猫，但是实际上所有的脊椎动物对猫排泄的卵囊都是可能被感染的。只要约100个卵囊就可能导致人患上临床弓形体病，这些卵囊可以在温暖、潮湿的环境中存活达1年以上[125]。

26.1.3.1 症状、诊断与治疗

在多数个体患者中，弓形体病是无症状的，但是当症状发生时，可能出现带皮疹发热、头痛、肌肉酸痛和淋巴结肿胀。这种肌肉酸痛可能是很剧烈的，可能会延续1个月或更长时间。这时的某些症状类似于传染性单核细胞增多症。

这种疾病是由于摄入了弓形体卵囊（例如从猫粪中）引发的，当卵囊通过肠道时，由于消化酶的作用而释放出8个子代孢子。弓形体卵囊呈卵形，直径为10~12μm，具有一层厚壁。子代孢子呈月牙形，大小为3μm×7μm，它们在动物寄主组织外不能长期存活，也不能在胃中的环境下存活。在肠道中释放出来之后，它们能够穿过肠壁，并在身体的许多其它部分迅速繁殖，导致临床综合征。它们最快的繁殖形体被称为速殖体，在受到免疫胜任（寄主有免疫能力的状态）的情况下，它们最终能形成一种被保护性外壁包裹起来的聚集体。这时一种组织结构，其中包藏的原生动物称为缓殖体。这些卵囊直径为10～200μm，其中的缓殖体比活力旺盛的速殖体的形体要小一些。缓殖体可能在个人整个生命过程中都存在于体内，但是如果卵囊被机械地破碎或在免疫反应作用下破裂，缓殖体就会被释放出来而开始迅速繁殖，称为速殖体，这样就导致了一次新的急性感染。缓殖体外一层保护性壁的形成是与寄主永久免疫力的形成是同步的。弓形体卵囊正常情况下是位于寄主的细胞内。鼠弓形体感染在绝大多数人体内都是无症状的（免疫胜利状态），但是在先天感染和免疫缺陷（例如艾滋病患者）的情况下，这种病就要危险得多。

与某些其它肠道原生动物病不同的是，弓形体病不能用检验粪便中是否有卵囊存在的方法来确诊，因为这些卵囊只存在于猫粪便中。有多种血清学方法广泛地用于急性感染的诊断。急性发作期与康复期的血清样品相比，其中的免疫球蛋白G（IgG）抗体滴度水平升高4倍，这是诊断急性感染的指标之一。测定免疫球蛋白M（IgM）的抗体能够更快地确诊急性感染，这种抗体在感染的第一周内出现，在第二到第四周内达到最大峰值[126]。诊断的其它方法还有：次甲基兰染色试验、间接红血球凝集试验、间接荧光免疫试验和免疫电泳。在间接红血球凝集试验中，若抗体滴度高于1:256一般表明有急性的感染。

虽然弓形体感染可以诱导保护性的免疫力，但是它在一定程度上是一种细胞免疫作用。在许多细菌感染（细胞被巨噬细胞吞噬）的情况下，巨噬细胞内部颗粒释放出酶使细菌崩解。在这一过程中，有氧呼吸变成了厌氧糖酵解作用，从而导致了乳酸的生成和pH降低。这种环境有促使摄入的细菌被杀死并伴随有过氧化物的生成，过氧化物在酸性pH下会产生单态氧（O_2）。这种单态氧毒性是相当强的。鼠弓形体速殖体与众不同的是，一旦它们被巨噬细胞吞噬之后，并不能引发H_2O_2的产生，也不能降低pH和生成单态氧。另外，它们可以驻留在巨噬细胞的空泡内，不会被预先生成的二次溶酶体所分解。因此除了已经提到过的性能之外，弓形体感染的模式似乎涉及到一种细胞膜结构的改变，使得它们不会被细胞内酶或生物合成组织所溶解[41]。T-细胞在对鼠弓形体的免疫力方面起着重要的作用，这一点可以用无毛老鼠来实验证实，当来自鼠弓形体感染的正常鼠的T-细胞被注入到无毛老鼠体内后，能赋予后者抵抗鼠弓形体高度毒性菌株感染的能力[24]。

治疗弓形体病的药物有磺胺药物、乙胺嘧啶、乙胺嘧啶加克林霉素或氟氯唑。乙胺嘧啶是一种叶酸的拮抗剂，能够抑制二氢叶酸还原酶。

26.1.3.2 鼠弓形体分布

弓形体病被认为是一种普遍形的感染，它在热带地区的发生率较高，在寒冷气候下的发生率较低。据估计，50%的美国人在成年时具有抗鼠弓形体的循环抗体[22]。在一份对美国新兵的研究中发现，13%的人呈弓形体抗体阳性[28]。在美国，据估计每年有3000多名婴儿受到了鼠弓形体的感染，因为它们的母亲在怀孕期间受到了感染[25]。胎儿的感染有17%出现在怀孕的前3个月，而有65%出现在后3个月，其中3个月的感染危害更为严重[42]。在被测试鼠弓形体抗体的3000名怀孕妇女中，有32.8%为阳性[44]。

Fayer和Dubey[23]回顾了对肉用动物中鼠弓形体抗体的普查情况，他们报道了被普查的牲畜达16 000多头，其中25%含有抗体，从鼠粪中摄入而感染的卵囊在牲畜体内的驻留时间长达267d，它们最多被发现在肝脏中。在9000多只绵羊中，平均有31%含有抗体，摄入的卵囊驻留了173d，其中多数被发现驻留在心脏中。猪体内的结果也很类似，29%含有抗体，摄入的泡囊驻留了171d，其中多数在脑和心脏中。而对于山羊，卵囊在体内驻留了441d，其中多数发现在骨骼肌肉中。因为上述肉用动物是草食动物，Fayer和Dubey[25]认为饲料和水源被来自猫粪的卵囊污染是感染的最终来源，因为许多农场中养猫来对付老鼠。

26.1.3.3 食品起因的疾病

由于食品起因导致弓形体病的人数还不知道，但是据估计美国在1985年各种来源的患弓形体病总计人数为230万人（表26.1）。这个估计数量远远超过了所有其它原生动物疾病有纪录的病例总数。

表26.1 美国1985年临床可见症状原生动物感染的估计数[27]

感染病症	涉及人数	感染病症	涉及人数	感染病症	涉及人数	感染病症	涉及人数
阿米巴虫病	12 000	隐孢子虫病	50	贾第鞭毛虫病	120 000	弓形体病[a]	2 300 000

[a] 不包括先天性的。

新鲜肉中可能含有弓形体卵囊。早在 1954 年，未煮透的肉就被怀疑是人弓形体病的根源[38]。在 1960 年对新屠宰肉类的研究中，50 份猪肉样品中有 24%、86 份绵羊肉中有 9.3%含有弓形体卵囊，而 60 份牛肉样品中只有 1 份含有这种卵囊[40]。与其它肉用动物相比，鼠弓形体更容易从绵羊体内被分离出来[38]。下面是被报道或证实的一些病例：

在法国 20 世纪 60 年代初，641 名儿童在住进一家肺结核病医院后，在 31%儿童成为鼠弓形体血清阳性。当时这些儿童每天另外供给两餐未煮透的绵羊肉，弓形体病的患病人数也增加了 1 倍。报道者认为，这家医院供给未煮透的绵羊肉的习惯是感染率很高的原因[22]。

在一家教育机构中，771 名被调查的母亲回答了关于对肉类烹调程度的偏好问题。在偏好深度煮透的人中，78%具有弓形体抗体；在喜欢不太煮透的人中，85%呈抗体阳性；在喜欢不煮透或生吃的人中，93%具有弓形体抗体[22]。这些调查者未对牛肉、绵羊肉或马肉进行区分。他们还报道了在法国有 50%儿童在 7 岁前感染了鼠弓形体，据认为这是由于食用了未煮透的肉类之故。

①1968 年在纽约市的 35 名医学专业学生在同一个小餐厅食用了未煮透的汉堡包之后，有 11 人体内的弓形体抗体升高，其中有 5 人患了临床弓形体病[44]。

②1974 年，1 名 7 个月的婴儿在食用了未经巴氏灭菌的山羊乳之后患上了临床弓形体病。虽然从山羊乳中分离不出鼠弓形体，但是该羊群中有些山羊的鼠弓形体抗体滴度高达 1512，这名患病婴儿的滴度达到了 116 000 以上[64]。

③1978 年，在加利福尼亚州北部的一个有 24 人的大家庭中，有 10 名成员在饮用了来自被感染山羊的原乳后患上了弓形体病[68]。

④在巴西圣保罗市，有 110 名大学生在食用了未煮熟的肉之后感染了急性弓形体病[14]。

既然上述多数病例被追溯到肉类，所以食用了生的或未煮熟的肉就有被感染的危险。有关其它涉及肉类的感染事件可以参阅另一篇综述[72]。

26.1.3.4 控制

人类的弓形体病可以通过避免环境被猫粪污染和避免食用含有活组织细胞的肉和肉制品进行预防。鼠弓形体卵囊可以被加热到 60℃以上的温度杀死，或被 0.3kGy 或更高的辐射剂量杀死[25]。这种生物也可以被冷冻作用致死，但是冷冻的效果变化很大，所以不能以冷冻作用来杀死卵囊。

26.1.4 肉孢子虫病

已知肉孢子虫属（*Sarcocystis*）中至少包括 13 个种，其中 2 个种能导致人肠道外疾病。其中一种是从牛体内获得的人肉孢子虫（*S. hominis*），另一种是从猪体内获得的猪-人肉孢子虫（*S. suihominis*）。人是这两种寄生虫的终端寄主，人肉孢子虫的中间寄主是牛，而猪—人肉孢子虫的中间寄主是猪。

当人摄入了肉孢子虫之后，它的缓殖体被释放出来，并穿过小肠的薄层组织，在其中进行有性繁殖，形成孢子囊。这种孢子囊可以随着牛的粪便被排出体外。当孢子囊被猪或牛摄入时，就会释放出孢子体，并扩散到整个体内。这时它们进行无性繁殖，在骨

骼和贲门肌肉中形成肉孢子虫。在这一阶段，它们有时被称为“米氏管”。含有缓殖体的肉孢子虫肉眼可见，它的直径可达 1cm[14]。

有很多研究测定了肉孢子虫的相对感染性。在 5 次研究中，有 20 位志愿者食用了被人肉孢子虫感染了的生牛肉后，有 12 人被感染，并排出了孢子囊，但是只有 1 人出现了临床症状[26]。发病症状可以在 3～6h 内出现，包括恶心、胃痛和腹泻。在其它 15 名食用了猪－人肉孢子虫感染了的生猪肉后，有 14 人被感染和排出了孢子囊，其中有 12 人在食用这种猪肉 6～48h 后出现了临床症状[26]。有 6 人在食用了煮得很透的感染猪肉后未见患病。在另一项对另一种肉孢子虫的研究中，狗在食用了半熟（60℃）或全熟(71.1～74.4℃）的牛肉之后未被感染，但是在食用了生的或低温加热（37.8～53.3℃）的牛肉后出现了感染。狗在食用了在家用冰箱中储存了 1 周的生牛肉之后未被感染[27]。在另一项研究中，有 2 名志愿者在食用了 500g 绞碎的被肌肉孢子虫（*Sarcosporidia*）感染的生横膈牛肉之后排泄孢子囊达 40d[56]。

因为牛和猪是这些寄生虫的中间寄主，因此它们可能通过食品传染给人类是显而易见的。

26.1.5 隐孢子虫病

原生动物中的小型隐孢子虫（*Cryptosporidium parvum*）早在 1907 年就已经被描述过存在于无症状的老鼠体内，几十年来，已知它是至少 40 种哺乳动物和不同数量的爬虫和鸟类的病原体。虽然它直到 1976 年才被证实在人体中存在，但是这种病在世界范围内普遍存在，其中腹泻症有 1%～4%是由这种病引起的[70]，并且有可能还不止这个数目。在英格兰和威尔士于 1985～1989 年的 5 年期间，已经鉴定出的这种病例分别有 1874、3691、3359、2838 和 7769 起[2]。在上述期间，这种病是第四种最常见导致腹泻的病症。据估计，这种病在某些医院中能导致艾滋病人中 7%～38%的人感染[74]。小型隐孢子虫在腹泻粪便中的发生率与兰氏贾第鞭毛虫类似[79]。在免疫胜任状态的人体内，这种病是“自身限制性”的，但是在免疫缺陷的个体（例如艾滋病患者）中会造成严重的感染。这些据知至少在某些水体中存在（见下述），因此也存在着传播给食品威胁。通过粪便－口人的传染是最重要的途径，但是由食品和乳品直接传播是不大可能的。

小型隐孢子虫是局限在细胞内的球形寄生虫，在一个寄主中完成它的生命循环。它的厚壁卵囊被摄入之后，在小肠中会释放出孢子体，这种游离的孢子体可以穿过寄主肠道细胞的微绒毛区域，在此进行有性繁殖导致接合子的形成。它们能溶解自身的和寄主的细胞膜而进入寄主细胞。在寄主细胞内，约有 80%来自厚壁卵囊的接合子可以产生孢子[18]。寄主粪便中会排出对环境有抗性的卵囊，这些卵囊被摄入后即会感染其它寄主。

小型隐孢子虫的卵囊呈球形至卵形，大小为 4.5～5.0μm。每个产孢子的卵囊含有 4 个孢子体。这些卵囊对自然环境有很强的抗性，在潮湿的冷环境中可以存活几个月[61]。据报道，它们可以被 50%或更高浓度的氨水，和 10%或更高浓度的甲醛处理 30min 后致死[10]。这些研究者还报道温度在高于 60℃或低于－20℃时，小型隐孢子虫卵囊也会致死。

据报道，将上述卵囊置于 45℃下维持 5～20min 可以消除它们的感染能力[1]。在一项研究中发现，这些卵囊在蒸馏水中储存 2 个月后丧失了其感染能力，或在 15～20℃2 周

后或在37℃5d后也丧失了其感染能力[71]。在后来的研究中，卵囊在冷冻条件下不能存活，即使在不同的保护剂中也未见存活。普通使用的杀虫剂对这种卵囊无效[9]，用臭氧和氯化物可以证实这一点。要致死90%或90%以上的小型隐孢子虫卵囊，1mg/kg臭氧需要处理5min，1.3mg/kg二氧化氯（ClO_2）需要处理60min，氯气和单氯胺各为80mg/kg时需要约90min[48]。小型隐孢子虫卵囊对ClO_2的耐受性要比贾第鞭毛虫泡囊强14倍，因此这些研究者认为，杀死水中的小型隐孢子虫卵囊来消除它的感染是不可靠的。

人类感染隐孢子虫病至少要通过已知的五种传播途径之一：动物、人体、水体、医院或食品。动物途径（从脊椎动物到人）是最有可能出现的途径，已经感染的动物（例如牛）的排泄物接触的人就可能导致感染。饮用未经处理的水也可能获得感染。在来自华盛顿和加利福尼亚4条河流的11份水样品中，上述卵囊的含量在2～112/L之间[58]。虽然对人体的最低感染剂量还不清楚，但2只灵长类动物在摄入10个卵囊之后都被感染[2]。这种寄生虫也是旅行腹泻症的病原体[76]。

26.1.5.1 症状、诊断与治疗

人类隐孢子虫病的临床症状与人体的免疫状态有关，对于免疫缺陷者这种病的症状最为严重。在免疫胜任的个体中，这种微生物主要寄生在上皮细胞内和导致腹泻。这时的病症是“自身限制性”的，潜伏时间为6～14d，典型症状会延续9～23d。在免疫缺陷个体中，腹泻剧烈而呈水状，据报道1d的排便次数可达71次，排便量达17升[24]。腹泻的排便中有时带有黏液，但很少有血液。腹痛、恶心、呕吐和低烧（低于39℃）发生的比例比腹泻低，症状在免疫缺陷者身上可以延续30d以上，但在免疫胜任者身上一般不到20d（范围：4～21d）。从Milwaukee发生的时间中看（见下述），285名患者表现的症状（比例）如下：水样腹泻（93%）、腹绞痛（84%）、发热（57%）、呕吐（48%）[53]。症状的平均延续时间为9d（范围：1～55d），每天大便的平均次数为12次（范围：1～90次）。1988年发生在美国加利福尼亚州涉及到游泳池感染的事件中，60名游泳者有44人被感染，他们表现的症状（比例）如下：水样腹泻（88%）、腹绞痛（86%）和发热（60%）[11]。采用一种改良的酸性培养基可以将这种寄生虫从某些患者的粪便中鉴定出来。它们的卵囊一般在腹泻阶段之后仍然存在。

隐孢子虫病的诊断需要鉴定卵囊在患者粪便中是否存在。镜检时可以采用染色方法，也可以采用改进的酸性培养、负染色和糖液浮选方法。一种最近描述的用于粪便中卵囊检测的方法是直接荧光免疫检测法[76]。这后一种方法是采用了一种作用于卵囊壁抗原的单克隆抗体。

在隐孢子虫病的治疗上曾经试验了100多种方法，但它们被发现都没有什么效果[26]，但是螺旋霉素、氟氯康唑和两性霉素B显示出一定的疗效。

26.1.5.2 水与食品引发的感染事件

第一起被证实是1984年发生在美国得克萨斯州布劳恩站的水致隐孢子虫病感染事件，发病是在饮用了自流井水后引起的。这次实际上是两起事件，一起发生在5月，另一起发生在7月，涉及患者79人[21]。第二起事件于1987年发生在乔治亚州的卡罗尔顿，涉及患者13 000人，在被检测的147名患者中，有58人粪便中含有隐孢子虫卵囊[32]。在1988—1989年间，英国发生了3起独立的隐孢子虫病流行事件，其中有一起事件涉及患

病人数多达5000人，其中有500人被证实是饮用了处理过的水感染的[74]。在另一起事件中，有62人被查出与污染了的游泳池水有关。1990年，苏格兰也有一起流行事件。

有文献记载的一起单独发生的最大的流行事件于1993年春季发生在美国威斯康星州的米尔沃基。据估计被感染的人数达403000人[53]。隐孢子虫的卵囊通过了这个城市的水处理厂，在卵囊通过的高峰阶段被处理的水的浊度增加。

虽然粪便—口人是已知的传播途径，但通过食品和乳品的途径至少在一起事件中被怀疑是感染的根源。这起发生于英格兰的事件中有一位32岁的男子在食用了冷冻的生牛内脏后感染了临床隐孢子虫病。隐孢子虫的卵囊被证实在未食用的牛内脏中存在，这是第一起证实卵囊在剩菜中存在的人体感染[18]。

26.2 扁形虫

所有的扁形虫都属于扁形动物门，本部分将讨论的扁形虫属于下述两个纲：

扁形动物门（Platyhelminthes）
- 吸虫纲（Trematoda）（吸虫 flukes）
 - 复殖亚纲（Digenea）
 - 棘口目（Echinostomata）
 - 片吸虫科（Fasciolidae）
 - 片吸虫属（*Fasciola*）
 - 姜片虫属（*Fasciolopsis*）
 - 斜睾目（Plagiorchiata）
 - 隐孔科（Troglotrematidae）
 - 并殖吸虫属（*Paragonimus*）
 - 后睾吸虫目（Opisthorchiata）
 - 后睾吸虫科（Opisthorchiidae）
 - 支睾吸虫属（*Clonorchis*）
- 绦虫纲（Cestoidea）
 - 多节亚纲（Eucestoda）（绦虫 tapeworms）
 - 假叶目（Pseudophyllidea）
 - 裂头科（Diphyllobothriidae）
 - 裂头绦虫属（*Diphyllobothrium*）
 - 环叶目（Cyclophyllidea）
 - 带绦虫科（Taeniidae）
 - 带绦虫属（*Taenia*）

26.2.1 片吸虫病

片吸虫病也称为寄生性胆硬化和肝腐烂症，它是由于摄入了肝片吸虫（*Fasciola hepatica*）引起的。这种病在世界范围的人群中广泛分布，在饲养绵羊和牛的场所这种微生物的存在量增多，这些动物和人是片吸虫的终端寄主。这些寄生虫在胆管内成熟，形成尺寸较大（150μm×90μm）的有囊盖的虫卵，它们会从胆管进入食道，最终随粪便排出

寄主的体外。在水中经过 4～15d 后发育成幼体，进入水螺体内转化成孢子囊。这种孢子囊产生出母蚴，母蚴再转变成子蚴和尾蚴。当尾蚴逃出水螺体时，它们则游离于水中，或依附于水草和水芹上，这时被包埋起来形成中间蚴。当被终端寄主摄入后，中间蚴在十二指肠中逃出包埋体，穿过肠壁进入空腔中。它们可以从体腔中进入肝脏，摄取营养，再在胆管中驻留下来，再进一步成长成熟[14,61]。

牛和绵羊感染片吸虫病会导致肝的病变，从而带来严重的经济问题。人类可以感染是已知的事实，尤其在法国，常常由于食用生的或未煮熟的含有中间蚴的水芹而被感染。片吸虫病人体感染在美国出现得较少，只局限在南部地区[35]。

咽部片吸虫病（哈尔宗病）是摄入了含有片吸虫的牛肝引起的，它的幼虫在触及口腔或咽部外膜时导致疼痛、口干和咳嗽。

症状、诊断与治疗：人体摄入片吸虫后约需 30d 才显示出症状，这些症状包括发热、不舒服、疲劳、食欲不振、体重减轻和肝部范围疼痛。这种病典型地伴有嗜曙红细胞过多症。片吸虫病可以用检验虫卵在粪便、胆汁或十二指肠中的存在进行诊断。这种病可以口服吡喹酮进行有效的治疗[61]。

26.2.2 姜片虫病

姜片虫病是由布氏姜片虫（*Fasciolopsis buski*）引起的，这种姜片虫的生态特性与肝姜片虫（*F. hepatica*）类似。人类是它们的终端寄主，数种水螺是它们的第一中间寄主，水生植物（水芹果实）是第二中间寄主。与肝姜片虫不同的是，这种寄生虫出现在人和猪的十二指肠和空肠中，在泰国的一个地区，人的感染比例高达 40%，这些地区习惯生食一些水生植物[14]。

人体姜片虫病发病症状与寄生虫在体内的数量有关，当只有少数虫寄生在体内时不一定出现症状。发病症状可能在初始感染后 1～2 个月内出现，症状包括剧烈腹泻、腹痛、体重减轻和一般性虚弱。在极端场合下也可能导致死亡[61]。这些症状似乎是由于寄生虫代谢物一般的毒性机制所致。

姜片虫病的诊断需要检验虫卵在粪便中的存在。布氏姜片虫卵的大小为（130～140）μm×（80～85）μm。氯硝柳胺和吡喹酮是治疗这种病的有效药物[61]。

26.2.3 并殖吸虫病

并殖吸虫病也称为寄生性咯血症，它是由并殖吸虫属（*Paragonimus*）的一些菌种引起的，尤其是卫氏并殖吸虫（*P. westermani*）。这种病主要在亚洲出现，但也常出现在非洲和中南美洲。猫肺并殖吸虫（*P. kellicotti*）被发现存在于美国北部和中部。与其它吸虫不同的是，卫氏并殖吸虫是一种肺部吸虫。

并殖吸虫的虫卵可以在终端寄主（人和其它动物）的唾液中排出，在潮湿环境中可以在 3 周内发育成幼体。这种幼体可以侵入水螺（第一中间寄主），在侵入水螺 78d 后可以发育成子蚴和尾蚴[14]。尾蚴进入第二中间寄主（螃蟹或虾）后被包埋在泡囊内。在某些东方国家和菲律宾，在一些淡水螃蟹的腿部和尾部肌肉中，它们形成中间蚴泡囊[61]。猫肺并殖吸虫的泡囊是在心脏区域形成的[61]。当终端寄主摄入了被感染的甲壳类动物之

后，它的中间蚴会从囊壳中孵化出来，穿过十二指肠壁转化为幼龄吸虫，然后进入肺部，在肺部成为被包埋在连接组织中的泡囊[61]。2～3 个月后，它们的金黄-褐色虫卵会出现在唾液中。

症状、诊断与治疗：并殖吸虫病具有严重的慢性咳嗽和明显的胸部疼痛症状。唾液中常带有微红-褐色或带血。当虫体进入肺部之后还会出现一些非专有症状[61]。这种病的诊断需要化验金黄 褐色虫卵在唾液或粪便中的存在。卫氏并殖吸虫卵的长度约为 80～120μm，宽度约为 50～60μm。另外在一种补体结合试验中滴度至少达到 116 才可以被诊断有感染的可能，ELISA 试验也可以采用。并殖吸虫病可以采用吡喹酮进行治疗[61]。

26.2.4 支睾吸虫病

扁形动物门中的吸虫纲一般认为是由侵袭哺乳动物肝脏、肺部或血液的被称为吸虫的寄生虫组成。华支睾吸虫（*Clonorchis sinensis*）或华后睾吸虫（*Opisthorchis sinensis*）是导致东方人胆硬化症的肝部吸虫。这些吸虫典型的具有 3 个寄主，其中包括两个中间寄主，幼虫或幼龄阶段在中间寄主中发育，而在终端寄主中完成它们的有性成年阶段。华支睾吸虫是一种体内寄生虫，它的前端嘴部周围长有吸盘，在中部体侧也长有吸盘。人、猫、狗、猪和其它脊椎动物可以作为它们的终端寄主。

当进入水中时，华支睾吸虫的虫卵会孵化成长有纤毛的幼虫（毛蚴），它们可以侵入第一寄主（一般是水螺）。作为幼虫进入水螺中之后，它们被包裹起来成为孢子囊，再通过无性繁殖形成胚胎体。每一个胚胎发育成一个幼体，幼体从孢子囊中逃出之后开始从寄主组织中吸收营养。这种幼体内的胚胎发育成尾蚴，尾蚴通过一个诞生孔从幼体中脱出，尾蚴是一种带有尾巴的小型吸虫。尾蚴脱去尾巴之后浮游于水中寻求它们的第二寄主，一般是鱼、虾等水生动物。它们也可以侵入新寄主之后再脱去尾巴，然后被一种泡囊包裹起来。在泡囊中进一步发育成中间蚴，再侵入终端寄主中继续发育。终端寄主一般是脊椎动物，包括人类。在摄入含有中间蚴的鱼类之后，它们的泡囊会在肠道中被溶解，使幼龄吸虫释放出来。幼虫通过血液扩散到身体的其它部位，其中华支睾吸虫侵入的是肝脏中的胆管，除了引发其它症状之外，它们能够导致硬化症（见下述）。

肝部吸虫病在中国、韩国、日本和东南亚地区是比较普遍的。据估计在亚洲感染这种寄生虫的人在 2 千万人以上[33]。在中国，感染这种病往往与生食一种称为圆腹雅罗鱼的鱼肴有关。已知约有 80 多种鱼体内含有华支睾吸虫[33]。

症状、诊断、治疗与预防：如果是温和性感染，支睾吸虫不会导致任何症状，但是在急性感染的情况下可能对肝脏造成损害。肝脏受损后会导致硬化和腹水，偶尔也能发展成肝癌[61]。

支睾吸虫病的诊断需要反复镜检粪便和十二指肠样液中是否有虫卵存在。ELISA 试验可能有助于检查，但是可能出现与其它吸虫的交叉反应。吡喹酮是一种有效的治疗药物。

预防这种寄生虫病需要避免将人的粪便排放到养鱼的水域中，但是这种要求似乎是不可能的。而避免食用生鱼和烹煮不当的鱼类是比较现实的措施。鱼体内的华支睾吸虫可以被杀灭圆形虫和扁形虫同样的条件杀死。Rodrick 和 Cheng[65]认为，所有的鱼类都可

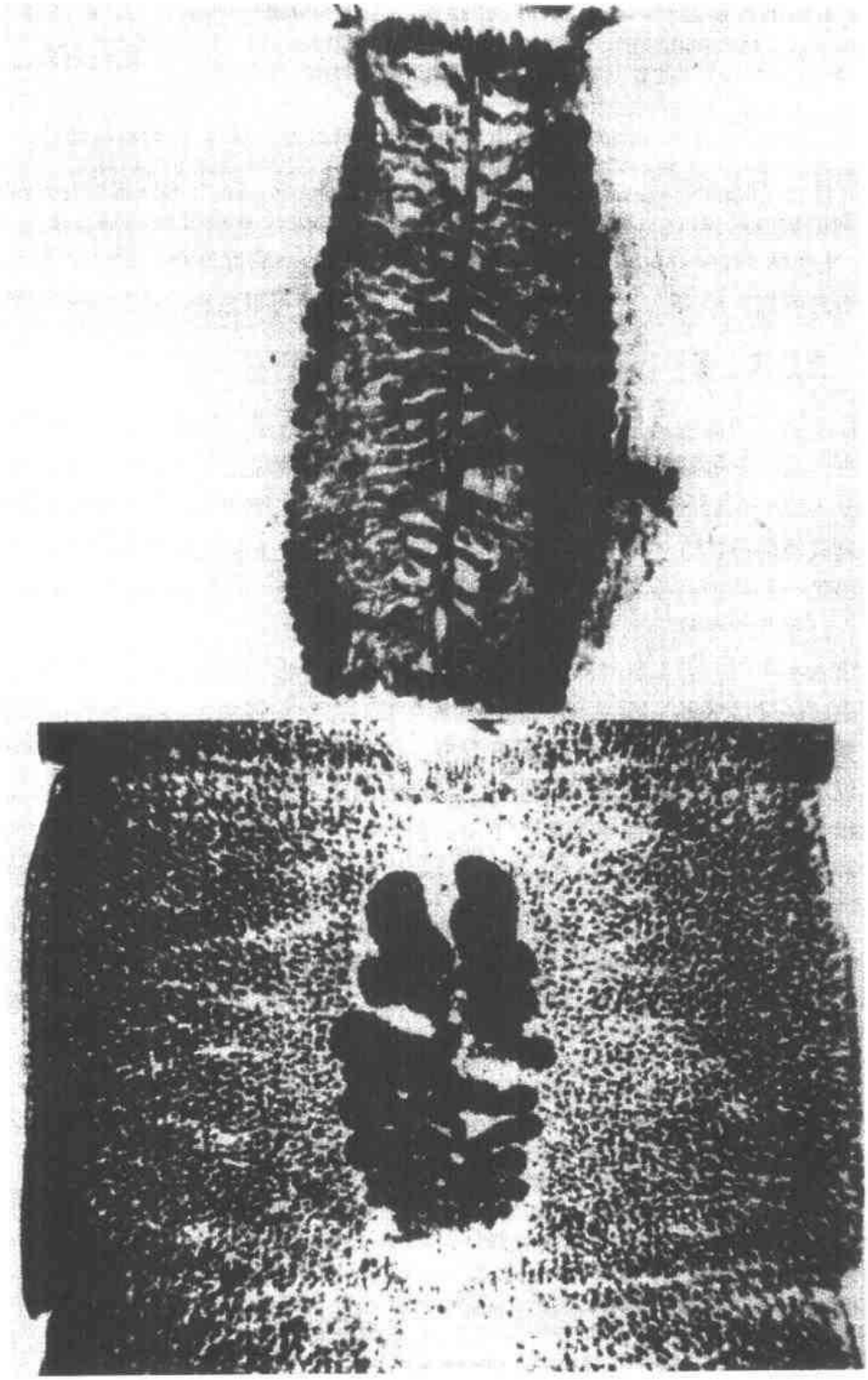


图 26.1　无钩绦虫节片（上图）和阔节裂头绦虫（下图）（×360）

注：摘自 S. H. Abadie, J. H. Miller, L. G. Warren, J. C. Swartzwelder, and M. R. Feldman, Manual of Clinic Microbiology 2nd.; copyright ©1974 by American Society for Microbiology, used with permission.

能是寄生虫的潜在载体，吸虫、扁形虫、圆形虫和原生动物都是如此。

26.2.5 裂头绦虫病

裂头绦虫病是由于食用了生鱼或未煮透的鱼而感染的，它的病原体是阔节裂头绦虫（*Diphyllobothrium latum*），这种绦虫常常被称为“宽鱼绦虫”。阔节裂头绦虫的终端寄主是人类和其它食鱼的哺乳动物，中间寄主是各种淡水鱼类和鲑鱼，裂头蚴（中间蚴）是在这些中间寄主中发育的。

当人食用了含有裂头蚴的鱼肉之后，这种幼体就会利用头部两侧的吸沟吸附到回肠黏膜上，并且在3～4周内生长成熟。绦虫成熟时，由节片组成的链体可以增长到10m以上，或接近20m，每一条绦虫可能有3000～4000节节片，每一节片的宽度要大于它的长度（因此它们被称为宽鱼绦虫）（见图26.1）。一条绦虫每天可以向患者的肠道中排出1百万颗以上的虫卵。这些虫卵在粪便中比在节片中存在的数量更多，它们对人体没有感染性。

当人的粪便排放到水体中时，虫卵被孵化出来，成为带有6只钩状物的自由浮游蚴幼体（也称为钩球蚴）。当这些侵入小型甲壳类动物［挠足类或微甲壳类动物，例如剑水蚤（*Cyclops*）］中时，它们转化为第二阶段形式，称为中间蚴或原尾蚴。当鱼摄入了这些小型甲壳动物时，原尾蚴可能会迁移到鱼的肌肉中，发育成裂头蚴。如果这种鱼被更大的鱼摄食之后，裂头蚴则进一步迁移，但不能进一步生长。人在食用了这些含虫的鱼之后也可能被感染。

26.2.5.1 流行

人类患绦虫病的简史概括在表26.2中。虽然人类患这种病早在1906年就已经有过报道，但是直到20世纪80年代初由于这种病的扩散才引起了美国和加拿大对这种病的注意。这种病是由于食用了一种称为寿司的日本食品而感染的。寿司长期以来在某些东方国家流行，但是直到最近才开始在美国流行。裂头绦虫病在欧洲的斯堪的纳维亚和波罗的海地区发生率较高。据估计患病人数在欧洲有5百万人，在亚洲有4百万人，而在北美洲有10万人。但是1977年在加拿大拉布拉多检验的275名无症状的当地人中，只有1人的粪便培养物中呈这种绦虫阳性[534]。

表26.2　　1977—1981年间在美国和西部海岸地区报道的裂头绦虫病病例

年　份	总患病人数	西部海岸地区患病人数	占总人数比例/%
1977	121	15	12
1978	133	16	12
1979	171	17	10
1980	204	64	31
1981	203	51	25

注：（1）西部海岸地区包括阿拉斯加、加利福尼亚、夏威夷、俄勒冈和华盛顿。

（2）摘自：A. J. Ruttenber, B. G. Weniger, F. Sorvillo, R. A. Murray, and S. L. Ford. 1984. *Amer. J Trop. Med. Hyg.* 33：455～459。

26.2.5.2 症状、诊断与治疗

虽然多数裂头绦虫病没有症状，但是患者可能会表现出上腹痛、腹绞痛、呕吐、食欲不振、头昏和体重下降。肠道阻塞还未曾出现。这种感染的结果之一是维生素 B_{12} 缺乏症，以及巨噬细胞贫血。裂头绦虫病的诊断可以检测虫卵在粪便中是否存在。治疗的方法与治疗带绦虫病相同。没有明显的症状不能说明绦虫在体内就不存在，因为此虫可以在体内生存多年。

26.2.5.3 预防

裂头绦虫病可以用避免食用生的或未煮透的鱼类进行预防。虽然避免向水源中排放粪便污水有助于减少这种病的发生率，但是它不能破坏这种寄生虫的生活循环链，因为人类并不是这种虫的惟一终端寄主。烹调鱼时使其内部温度达到 60℃维持 1min 或达到 65℃维持 30s 可以杀死这种寄生虫[6]，如果将鱼冷冻至 -20℃维持 60h 以上，也可以杀死这种寄生虫[42,43]。

26.2.6 囊尾蚴病/绦虫病

人体的这两种病症是由两种扁形虫引起的：无钩绦虫（*Taenia saginata*）[也称为牛肉带吻绦虫（*Taeniarhynchus saginatus*）] 和猪肉绦虫（*Taenia solium*）（猪绦虫）。在扁形和圆形寄生虫中，它们的特点在于它们的终端寄主是人，它的成年和有性阶段是在人体内完成的，而幼虫或青年虫阶段是在草食动物体内完成的。这些寄生虫没有血管、呼吸或消化系统，也没有体腔，它们在整个营养生长阶段都依赖于人体寄主的消化能力。它们的代谢基本上是无氧代谢。

无钩绦虫节片的结构如图 26.1 所示。它的成虫具有一个约为 1mm 大小的头节（头部），头节上没有吸钩，但是具有 4 个吸盘。在头节后面有一个连接性的颈部，连接到节片组成的链带上。生长过程中链带的长度不断增加，最先生成的节片离开头节最远。每一段节片都具有一套完整的繁殖结构，成虫可以具有多达 2000 多节节片。这些绦虫可以在寄主肠道内生存长达 25 年，长成长度达 4～6m 的巨型成虫。无钩绦虫每天可以排除 8～9节节片，每个节片中含有 80000 只卵。这种卵对人体没有感染性。

当节片到达土壤中之后，它们会释放出它们的虫卵，虫卵的直径约为 30～40μm，含有发育完成的胚胎，可以存活达数月之久。当这些虫卵被草食动物（例如牛）摄入体内时，胚胎被释放出来，穿过肠壁，扩散到舌头、心脏、横膈膜、颌部和臀部的横纹肌中，在此胚胎转化为幼虫，称为囊尾蚴。囊尾蚴病是指这些寄生虫存在于中间寄主中的状态。在食草动物摄入虫卵之后，囊尾蚴一般需要 2～3 个月时间发育。当存在数量很大时，这些囊尾蚴会在牛肉组织中呈现出很多白点的状态。人类在摄入这种含有囊尾蚴的肉制品后就会被感染。

猪肉绦虫导致的感染与上述牛肉绦虫导致的感染十分类似，但是它们也有一些显著的不同之处。虽然人体也是它们的最终寄主，但是猪肉绦虫的幼虫阶段既可以在牛体内完成，也可以在人体内完成。换句话说，人可以作为中间寄主，也可以作为终端寄主，前一种状态称为囊尾蚴病，而后一种状态称为绦虫病，这样可以形成一种自身感染。由于这种原因，猪肉绦虫的感染比牛肉绦虫的感染存在着更大的潜在危害。猪肉绦虫幼虫引

起的感染有时也称为囊尾蚴纤维化病。猪肉绦虫的头节具有吸钩而不是吸盘，它的链体可能达 2～4m 长，仅含有约 1000 节节片。

猪肉绦虫的胚胎会存在于所有的体内组织中，包括眼睛和脑中，这一点与牛肉绦虫中不同。虽然牛肉绦虫存在于美国和世界上许多其它地区，但是据估计美国也存在猪肉绦虫。然而猪肉绦虫确实存在于拉丁美洲、亚洲、非洲和东欧地区。根据美国当地肉类监测部门报道，牛肉绦虫在美国牛肉中的出现率低于 1%。

26.2.6.1 症状、诊断与治疗

不论感染的绦虫是什么品种，多数绦虫病患者是无症状的，但是当人体作为中间寄主时情形就不一样了。当这些囊尾蚴病出现在体内时，囊虫会在身体组织中发育，包括中枢神经系统，一般会导致嗜红细胞增多症。

人类绦虫病的诊断只要检验虫卵和节片是否在粪便中存在，囊尾蚴病的诊断需要对钙化的囊虫进行组织切片检查，或采用免疫学方法。补体结合法、间接红血球凝集试验和荧光免疫试验等都有助于诊断。

人类绦虫病的治疗可以单独服用氯硝柳胺，这种药可以直接作用于寄生虫，可以有效地杀死成年虫体。这种药可以明显地抑制寄生虫线粒体中的磷酸化反应。另一种有效的治疗药物是吡喹酮。对于囊尾蚴病，可能需要做外科手术。

26.2.6.2 预防

预防和消除有多阶段寄主的绦虫病的总体方法是切断绦虫从一个寄主转移到另一个寄主的途径。因为虫卵会随人的粪便排出，所以适当的处理下水和人体排泄物可以避免绦虫病，但是猪肉绦虫对人体的感染是一个更为复杂的问题。将猪肉和牛肉加热到 60℃以上可以杀死其中的绦虫[39]。肉类冷冻到至少－10℃维持 10～15d 或浸泡在浓盐水中达到 3 周将会杀死这些寄生虫。有一组研究者发现要确保杀死感染牛肉中的绦虫，所需要的温度和冷冻时间如下：－5℃下 360h，－10℃下 216h，－15℃、－20℃、－25℃或－30℃下 144h[34]。

26.3 圆形虫

与食品有关的导致人类患病的重要圆形虫属于线虫纲的两个目。小杆线虫目包括醋线虫（*Turbatrix aceti*），它不是人类的病原虫，下面将不作详细讨论。

线虫纲（Nematoda）
- 有腺纲（Adenophorea）（无尾感器亚纲 Aphasmidia）
 - 毛吸虫目（Trichinellida）
 - 毛线虫属（*Trichinella*）
- 胞管肾纲（Secernentea）（尾感器亚纲 Phasmidia）
 - 小杆线虫目（Rhabditida）
 - 醋线虫属（*Turbatrix*）
 - 蛔虫目（Ascaridida）
 - 蛔虫属（*Ascaris*）
 - 异尖线虫亚科（Anisakinae）

异尖线虫属（*Anisakis*）
假地虫属（*Pseudoterranova*）
弓蛔虫属（*Toxocara*）

26.3.1 旋毛虫病

旋毛线虫（*Trichinella spiralis*）是旋毛虫病的病原虫，从食品传播的角度看，这种圆形虫病是最受人们关注的寄生虫病。旋毛虫最早是在1935年由J. Paget在伦敦进行了描述，第一例人体旋毛虫病是1859年在德国发现的[47]。虽然多数人类扁形虫和圆形虫病是由至少需要两种不同动物寄主的寄生虫引起的，但是毛线虫只是从寄主到寄主的传播，不存在自由活动的生命阶段。换句话说，旋毛虫的幼虫和成虫阶段都是在同一个寄主内度过的。这种虫的感染最多是由于食用了生的或烹调不当的猪肉引起的。

旋毛虫的成虫生活在包括猪、狗、熊、水生哺乳动物和人的十二指肠和空肠黏液中，是在食用了含有旋毛虫的肉类之后被感染的。成年的雌性旋毛虫有3～4mm长，成年雄性虫约只有这个长度的一半。虽然它们能滞留在肠道中约1个月，但是不会引发什么症状。虫卵会在雌虫体内孵化，每只雌虫可以孕育约1500个卵。这种孵化出来的幼虫每只长度约为0.1mm，它们会在肠壁上钻出空穴和散布到整个寄主体内，最后固定栖息在某些肌肉中。只有那些能钻到骨骼肌肉中的虫才能成活和生长，其它场所的虫都会被杀死。它们能够寄生的特定肌肉包括眼部、舌部和横膈膜处的肌肉。为了研究毛线虫幼虫在猪肉中的行为，美国农业部采用横膈膜肌肉和舌部组织进行过试验。在最近的一项研究中发现，每克横膈膜后部的肌肉能比其它肌肉产生出更多的幼虫[50]。幼虫在肌肉内钻穴几周之后，可能导致剧痛、发热和其它症状，有时因为心脏衰竭还会导致死亡（见下述）。当幼虫在肌肉中长到1mm左右时，它们卷曲后会被包埋起来，封闭在一种钙化的壁内长达6～18月之久（图26.2）。这种幼虫直到被另一种动物（包括人）摄入之前不再进一步发育，但是在活寄主体内可以存活达10年之久。当含有这种包埋体的肉类被第二个寄主摄入后，被包埋的幼虫在胃中的酶作用下被释放出来，并且在肠腔中发育成熟。

26.3.1.1 传播与流行

约有75种动物可以被旋毛虫感染，但是鸟类似乎对它具有抗性[55]。在20世纪30和40年代，约有16%的美国人被感染[53]。在1966—1970年期间，美国在对屠宰后的肉类检验中发现有4.7%横膈膜肌肉中含有毛线虫。在1977—1981年的5年期间，美国报道的感染人数达686例，其中有4人死亡[76]。美国疾病控制中心的监测数据显示，在1983—1987年间有33起流行事件，涉及患病人数162人，其中1人死亡；在这5年期间平均每年的患病人数约为32人[5]。在1973～1987年的15年期间，美国疾病控制中心记载了128起流行事件，涉及患病人数总共843人，平均每年为56人[74]。但是，据估计1985年美国实际的患病人数为100 000人[7]。加拿大1982年记载的患病人数只有3人，而在1983—1984年间没有这种病的记载[78]。美国1965—1994年间的流行倾向可以参考图26.3。在1987—1989年的3年期间，每年报道的病例不足50例，而1990年报道的病例达到了120例[14]。其中有90例发生在衣阿华州，当时有250名来自东南亚的移民食用了生猪肉香肠。另外15例发生在弗吉尼亚州，其载毒食品也是猪肉香肠[14]。

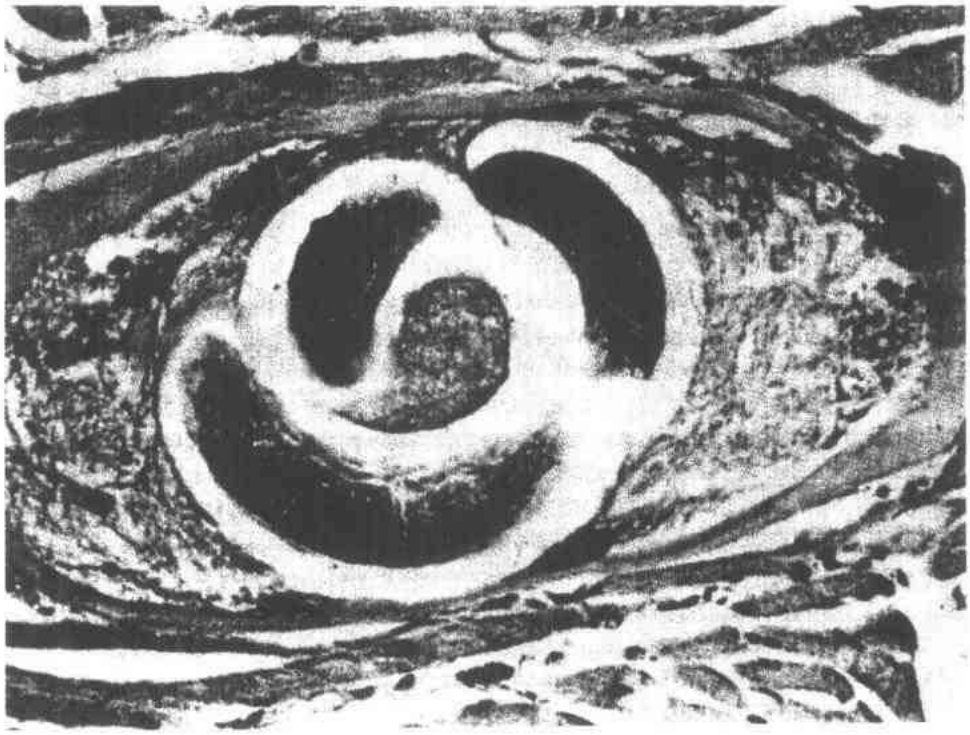


图 26.2 肌肉中的旋毛虫（×350）

注：资料来源：S. H. Abadie, J. H. Miller, L. G. Warren, J. C. Swartzwelder, and M. R. Feldman, Manual of Clinic Microbiology, 2nd ed.; Copyright © 1974 by American Society for Microbiology, used with permission.

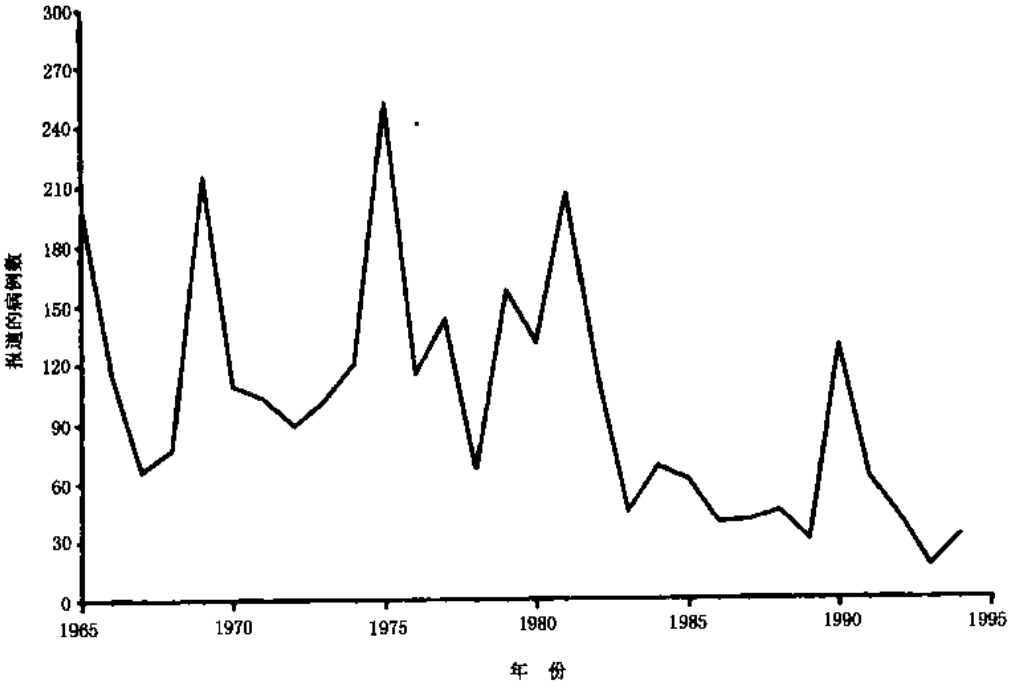


图 26.3 美国 1965 -1994 年间报道的旋毛虫病病例数[53]

在1975—1981年间，肉类导致的感染人数中，猪肉占79%，熊肉占14%，牛肉占7%。在对零售绞碎牛肉的检测中发现，3%～38%的牛肉样品中含有猪肉。绞碎牛肉中猪肉的存在可能是零售商有意掺假，或可能是因为两种产品使用了同一部绞肉机的缘故。

26.3.1.2 症状与治疗

在摄入了大量含有幼虫的肉类1～2d之后，毛线虫会穿过肠黏膜，导致恶心、腹痛、腹泻或有时呕吐。当只摄入少量幼体时，其潜伏时间可以长达30d。这些症状可以延续数天，或者症状很温和而被忽略。在初始症状出现约7～9d之后，上述幼体会侵入条纹肌。当每克肌肉中存在的幼体在10个或10个以下时，可能不会出现发病症状。当每克肌肉中存在的数量在100个或更多时，一般会发展成临床旋毛虫病；而每克肌肉中的积存数量达到1000以上时，会导致严重的急性症状。肌肉疼痛是肌肉受害的普遍症状，可能出现呼吸、咀嚼和吞咽困难等症状[55]。在起始感染后约6周时，幼虫的包埋体可能形成，这时伴有组织疼痛、肿胀和发热。这时人体具有对再次感染的抗性，这似乎是T-细胞的协同作用。噻苯达唑和甲苯达唑是治疗这种寄生虫病的有效药物。

26.3.1.3 诊断

因为毛线虫幼体以螺旋状存在于卵形具荚膜的泡囊中，这种泡囊在骨骼肌中，有时在三角肌、二头肌或腓肠肌中存在，用肌肉组织切片法可以检出。在这种病发生的第二周，一般会发展成嗜酸粒细胞显著增多的症状。在感染的第三周可以用一些免疫学方法检测出抗体的生成，其检测方法包括：硅藻土絮凝、胆固醇-卵磷脂絮凝和乳汁凝集。当硅藻土的滴度达到1∶5表明感染的量较大，但是这种试验呈阳性至少需要在感染3周之后。

26.3.1.4 预防与控制

控制旋毛虫病的流行需要避免食用含有这些虫体或幼体的肉类和其它被感染的动物组织，也要避免将肉类下脚料饲喂给有关动物。将未煮透灭虫的肉类下脚料饲喂给动物助长了这种虫的传播。在将肉类下脚料煮透再饲喂给猪的情况下，旋毛虫病发生率出现了急剧的下降。

这种疾病也可以用煮透肉类（例如猪肉和熊肉）的方法进行预防。在一份对烤猪肉中毛虫病幼体致死性质的调查中发现，当烤肉的内部温度达到60℃或更高的情况下，所获成品中未检出这种寄生虫[10]。在烤制温度为54.4℃或低于这温度，和有些在57.2℃的情况下，所有样品中都发现了存活的幼体。美国农业部认为，所有的肉制品在加工中用温度计检测时，如果任何部位的温度在恒定时未达到76.7℃，这种产品应该进一步加热[76]。

冷冻作用会致死包埋的幼体，但是冷冻时间和温度取决于被冷冻层的厚度和所含的旋毛虫品系（表26.3）。下述研究证明，冷冻温度越低，对旋毛虫的致死作用就越强。将被感染的猪肉绞碎后，以4种不同的厚度盛放到盘中，再装进盒内进行冷冻。当冷冻温度为－17.8℃时，旋毛虫在6～10d后失去活性，在－12.2℃冷冻11～15d后也失去了感染性[77]。当冷冻温度在－9.4℃时，56d后它们仍具有感染性；当冷冻温度在－6.7℃时，71d后它们仍具有感染性[83]。在干冰（－70℃）和液氮（－193℃）中冷冻幼虫即被杀死[49]。这些旋毛虫幼体被辐射致死的情况已在第五部分14中讨论过。

表 26.3 在不同温度下冷冻需要的时间

温度/℃	第 1 组/d	第 2 组/d
−15	20	30
−23	10	20
29	6	12

注：(1) 第 1 组 厚度<15.24cm，第 2 组 厚度>15.24cm。

(2) 摘自：*Sec.* 18.10. *Regulations Governing the Meat Inspection of the United States Department of Agriculture* (9 *CFR* 18.10, 1960).

A. W. Kotula, K. D. Murrell, L. Acosta-Stein, L. Lamb, and L. Douglass. *J Food Sci.* 48. 765～68. ©1983 by institute of Food Technologists.

Gammon 等人[29]研究了腌制和烟熏过程对存在于猪腿肉和肩胛肉中的旋毛虫活性的影响。他们在试验中采用了被旋毛虫感染的乳猪肉来感染狗肉。在腌制之后悬挂晾干 30d，再在 32.2～37.8℃下烟熏约 24h，然后再经过陈化。他们发现，在烟熏之后的 3 周内，腿肉和肩胛肉中都存在活的旋毛虫，而在 4 周之后均未检出旋毛虫。Childers 等人[15]研究了 NaCl 浓度、A_w 和发酵方法对美国乔治亚州意大利式腊肠中旋毛虫活性的影响。试验用香肠采用被感染的猪肉来制作。在 NaCl 浓度为 3.33%和高温 (46.1℃) 发酵制作的香肠中，不论产品的 pH 在什么水平，旋毛虫幼体在 30d 后都完全被杀死。在 NaCl 浓度为 3.33%和较低的温度发酵 30d 后，也未发现有幼体存活。在不加盐制作的香肠中，在 15～25d 内仍然有 25%幼体存活，但是 25d 之后未见有存活者。关于预防、检测和杀虫的主要控制步骤概括在图 26.4 中。

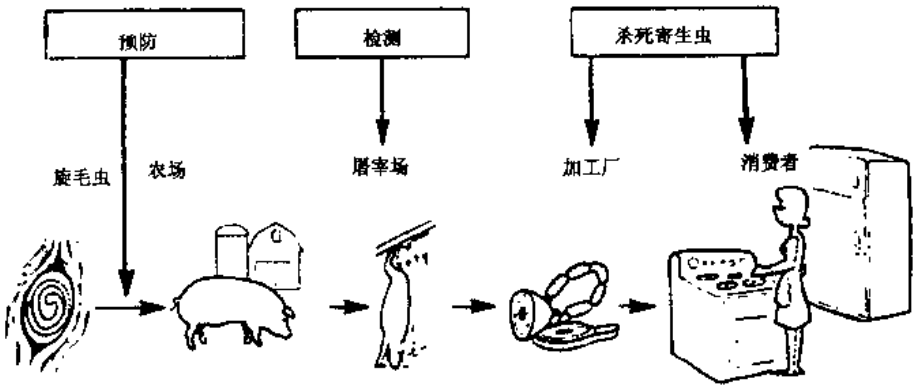


图 26.4 猪肉制品从农场到消费者的不同环节中应该采取的控制措施[3]

26.3.1.5 微波炉烹调

关于微波炉对旋毛虫幼虫的致死效率有多组研究者进行过研究。在一项对家庭制作方法进行指导性的研究中，Zimmerman 和 Beach[82]对多数旋毛虫感染的猪肉在微波炉中的加热时间（而不是对温度）进行了研究，他们将 51 份样品（48 份烤制品和 3 份猪排）放在 6 台不同的微波炉中加热后发现，9 份样品仍然保持了感染能力。在这 9 份样品中，

有 6 份中心烤制温度未达到 76.7℃，而其余 3 份在加热过程中的某一时刻超过了这一温度。这些研究者注意到，试验中所用的猪肉是来自被人为地用 250 000 只旋毛虫感染的猪，这头猪的每克组织中产生了约 1000 只旋毛虫，而自然感染的猪体内每克组织中只约有 1 只旋毛虫。虽然大量的旋毛虫可能在被加热处理的过程中对存活率是一个保护因素，但在微波炉中加热时的内在不均匀性也是一个重要因素。在另一份研究中发现，在微波炉中加热至 77℃或 82℃后未能杀死毛线虫幼虫，而在传统的加热炉、平面烤炉、木炭烤炉或油炸加热过程中，当内部温度达到 77℃时能杀死这些幼虫[59]。另外，将猪排在工业微波炉中解冻后，再在炭烤炉中迅速加热至 71℃或 77℃后，接入的幼虫仍然能存活[60]。

猪肉在微波炉中烹调时是否能杀死毛线虫幼虫显然是人们所关心的问题之一，传统烤炉比微波炉杀虫效率高的原因主要有两个方面：第一个原因是微波炉的加热速率很快，这样可能带来一定的问题。在传统式烤炉中烹调时，93.3℃下的慢速加热比 176.7℃下的快速加热对毛线虫幼虫的致死力强[61]。第二个原因是传统烤炉的加热比某些微波炉的加热更为均匀。如果产品能在微波炉中旋转或在微波炉中装备了自动旋转装置，这种不均匀性就可以减小到最低限度。否则，不均匀加热现象就会发生，导致产品的某些部分加热不透，而另一些部分被过度加热。关于在微波炉中控制恒定的烹调程度和生产安全产品的一些关键参数已经有文献报道[61]。

26.3.2　异尖线虫病

这种圆形虫感染是由两个密切相关的属和种引起的：单异尖线虫（*Anisakis simplex*）（俗称鲱虫或鲸虫）和戴西假地虫（*Pseudoterranova decipiens*）（旧拉丁名为 *Phocanema*，俗称鳕虫或海豹虫）。这两种寄生虫都有数个中间寄主，终端寄主一般也不止一种。人类并不是这两种虫的终端寄主，人类发病只是因为这些虫在生命循环的某一阶段偶然侵入体内造成的。

单异尖线虫的终端寄主是海洋哺乳动物——鲸，而戴西假地虫的终端寄主是灰海豚或其它海豚。这些海生动物的粪便中含有数千只虫卵，虫卵进入水中后经历它们的第一段换毛期（L1 阶段至 L2 阶段）。这些自由游动的幼虫被小型甲壳类动物（或桡足类动物），而这些小型动物又被大型甲壳类动物摄入，这样的中间寄主为它们提供了二次换毛期（L2 阶段至 L3 阶段）的发育场所。终端寄主可以摄入这些 L3 幼虫及它们的甲壳类中间寄主，但更常发生的情况是，L3 幼虫被鱼或鱿鱼摄入体内，而在线虫到达最终寄主之前这些水生动物又被更大的鱼类吞食。它们的最后两个换毛期（L3 和 L4）是在终端寄主体内完成的，在此它们发育成成虫，并且进行交配。有感染性的幼虫是 L3，主要存在于鱼类的内脏中或内脏表面，呈紧密的平面螺旋状，有些幼虫可能出现在鱼类的腹部拍动肌中。因为它们喜欢寄生在鲸体内，所以单异尖线虫更常发现于北太平洋的鱼体内。

对于戴西假地虫，虫卵随海豹粪便排出后也被桡足类动物摄入，L2 阶段或 L3 阶段初期的幼虫被第一寄主（鱼类）摄入。在鱼体内，它们穿过胃壁进入体腔，在鱼肌肉中掘出许多洞穴。在鱼体内，L3 幼虫可以生长到 25～56mm 长，颜色呈红色至褐色。海豹是摄入这些鱼之后成为终端寄主的，被海貌摄食的主要是胡瓜鱼和其它小型鱼类。

人类感染的原因是摄入了含有 L3 和 L4 阶段幼虫的鱼类。因此，异尖线虫并不能在

人体内成熟。异尖线虫病的症状是幼虫在体内活动的结果。单异尖线虫幼虫要比戴西假地虫的幼虫危害大，因为它们常常能穿过黏膜内壁，而多数戴西假地虫幼虫会随粪便排出，或在它们刺激黏膜时被咳出或吐出。异尖线虫最常发现于日本和荷兰，而假地虫最常发现于北美洲。

26.3.2.1 症状、诊断与治疗

人类异尖线病的症状可能在摄入被感染的鱼后 4～6h 之内出现，其症状包括上腹部疼痛、恶心和呕吐。在严重感染的情况下，摄入感染鱼后的 7d 内可能出现发热和血便。如果虫体穿过黏膜，可能会生成一种嗜曙红细胞颗粒，或这些幼虫穿过内脏壁而导致腹膜炎。但是，1982 年全年北美洲被感染的 23 人中，只有 5 人是由于单异尖线虫引起的，感染时也只是出现了暂时的症状[46]。在 Kliks[46]报道的 4 名患者中，所表现的症状为轻度的胃痛和恶心，其症状是在摄入虫体 20h 后出现的，在摄入被感染的生鲑鱼 2 周之后，在患者的口腔中发现了虫体。

异尖线病的诊断是困难的，因为粪便中没有虫卵或虫体的其它部分。肠道内的幼虫可以借助于内窥镜看到，被感染的组织可以用手术切片法检查。补体结合试验和间接荧光免疫试验具有一定的诊断价值。噻苯达唑是治疗这种病的有效药物。

26.3.2.2 流行与分布

已经有报道的异尖线虫病汇总在表 26.4 中。第一起有清晰记载的病例 1955 年发生在荷兰，在 1955—1965 年间，这个国家报道的这种病例超过 149 例。当一项法规规定鲱鱼必须被冷冻到－20℃保持 24h 后，在下一年中就没有染这种病的报道[36]。1964—1976 年间日本报道的病例超过了 1000 例[57]。在这些情况下生鱼食品（例如寿司和生鱼片）是含虫食品。而轻度腌制的鲱鱼（青鱼）在荷兰是常见的含虫食品。1976 年美国记载的染病人数有 6 人，加拿大、英格兰和格陵兰岛各有 1 人[54]。在南美洲，这种病与食用一种称为 ceviche 的生鱼菜肴有关，所涉及的病原体一般是太平洋线虫（*D. pacificum*）[65]。北美洲第一次关于这种病的报道是 1973 年发生在波士顿。在 1990 年全年中美国所报道的两种线虫感染的病例还不到 100 例。异尖线虫病也出现在比利时、英国、智利、丹麦、法国、德国、韩国和台湾。从 20 世纪 60 年代初开始的 15 余年时间内，日本报道的病例约有 1200 例。虽然生鲭鱼可能是东方地区这种病最重要的鱼类来源[65]，但是据认为含有这些寄生虫的真骨鱼类品种在 160 种以上[33]。

表 26.4 异尖线虫病病例汇总[36,54,57]

1955 年	第一起有清晰记载的病例发生在荷兰
1955—1965 年	荷兰约有 149 人患病
1964—1976 年	日本报道有 1000 多人患病
1973 年	北美洲第一起有记载的病例（波士顿）
1980 年	日本报道有 500 多人患病
1977—1981 年	加利福尼亚记载有 5 人患病（2 起由单异尖线虫引起，3 起由戴西假地虫引起）
1981－1989 年	北美洲约有 50 人由于单异尖线虫感染患病，30 人由于戴西假地虫感染患病

关于异尖线虫幼虫在鱼类中的存在状况，20 世纪 70 年代末期有过两次深入的调查。第一次是在美国威斯康星州对来自 20 个属和 23 个种的 1010 份鱼样品，在含有寄生性线虫的 703 份样品中发现了 6547 只线虫，这些线虫中只有 11 只是异尖线虫[47]。每条鱼中线虫幼虫的平均含量为 6.48 只，总感染率为 69.60%。

1974—1975 年间，美国对来自华盛顿、俄勒冈、加利福尼亚州的太平洋沿岸水域的鱼类和贝类进行了长达两年的监测，监测中抽取样品 2074 份[56]。异尖线虫是被发现的最多的线虫，其中多数是在鱼的内脏中或内脏表面发现的。在加利福尼亚州沿海捕获的鱼中，41.6%含有线虫幼虫[55]。这里的异尖线虫出现比例高于假地虫，而在圣劳伦斯的加拿大东部水域，这个比例正好相反，这主要是由于鲸数量分布的缘故[56]。在圣劳伦斯检测的 2000 份贝类样品中，未发现线虫幼虫。在密歇根州安恩阿伯（Ann Arbor）的一次监测中发现，鲑鱼组织中幼虫的密度为 63～91 只/kg，这些幼虫以活性形式存在[67]。

关于现在的商品鱼与几十年前的鱼相比其中线虫幼虫的发生率是否增加，所报道的数据是有一些矛盾的。显然，这些线虫不是捕鱼水域新来的成员，因为它们在鱼类中的存在早在 1767 年就已经被认识到了。现在一个普遍赞同的看法是，人类这种寄生虫病的增多是从 20 世纪 50 年代中期，冷藏设备被装备到远洋捕鱼船上开始的。在这之前，鱼类在捕获之后被除去内脏，这样感染的寄生虫就被除掉了。一些调查者认为，当鱼在冰箱中存放数天之后，这些寄生虫会随着鱼的死亡从内脏转移到肌肉中[44,56]。但是，寄生虫在鱼体内迁移的说法并没有得到所有研究者的认同。

26.3.2.3 预防

异尖线虫病可以通过避免食用生的或未煮透的鱼类而预防。寿司、ceviche 和萨西米等生鱼菜肴只能用经过检验证实不含感染幼虫的鱼为原料。具有感染性的幼虫可以在鱼被加热到内部温度达到 60℃保持 1min，或 65℃保持 30s 后被杀死[6]。据报道，在 -20℃或 -20℃以下至少冷冻 60h 才能将幼虫转变成无感染性的[42]，但是某些北美洲的品种在 -20℃下冷冻 52h 后仍能存活[6]。据发现在盐水中浸泡 4 周可以使幼虫转化为无感染性的[53]。

参 考 文 献

[1] Anderson, B. C. 1985. Moist heat inactivation of *Cryptosporidium* sp. *Amer. J. Pub. Hlth.* 75: 1433～1434.

[2] Barer, M. R., and A. E. Wright. 1990. *Cryptosporidium* and water. *Lett. Appl. Microbiol.* 11: 271～277.

[3] Barnard, R. J., and G. J. Jackson. 1984. *Giardia lamblia*: The transfer of human infections by foods. In *Giardia and Giardiasis: Biology, Pathogenesis, and Epidemiology*, ed. S. L. Erlandsen and E. A. Meyer, 363～378. New York: Plenum.

[4] Bean, N. H., and P. M. Griffin. 1990. Foodborne disease outbreaks in the United States, 1973–1987: Pathogens, vehicles, and trends. *J. Food Protect.* 53: 804～817.

[5] Bean, N. H., P. M. Griffin, J. S. Goulding, and C. B. Ivey. 1990. Foodborne disease outbreaks, 5-year summary, 1983- 1987. *J. Food Protect.* 53: 711～728.

[6] Bier, J. W. 1976. Experimental anisakiasis: Cultivation and temperature tolerance determinations.

J. Milk Food Technol. 39: 132～137.

[7] Bennett, J. V., S. D. Holmberg, M. F. Rogers, and S. L. Solomon. 1987. Infectious and parasitic diseases. In *The Burden of Unnecessary Illness*, ed. R. W. Amler and H. B. Dull, 102—114. New York: Oxford University Press.

[8] Boucher, S. -E. M., and F. D. Gillin. 1990. Excystation of in vitro-derived *Giardia lamblia* cysts. *Infect. Immun.* 58: 3516～3522.

[9] Campbell, L., S. Tzipori, G. Hutchinson, and K. W. Angus. 1982. Effect of disinfectants on survival of cryptosporidium oocysts. *Vet. Rec.* 111: 414～415.

[10] Carlin, A. F., C. Mott, D. Cash, and W. Zimmerman. 1969. Destruction of trichina larvae in cooked pork roasts. *J. Food Sci.* 34: 210～212.

[11] Centers for Disease Control. 1990. Swimming-associated cryptosporidiosis—Los Angeles County. *Morb. Mort. Wkly. Rept.* 39: 343～345.

[12] Centers for Disease Control. 1989. Common-source outbreak of giardiasis—New Mexico. *Morb. Mort. Wkly. Rept.* 38: 405～407.

[13] Centers for Disease Control (U. S.). 1991. *Trichinella spiralis* infection—United States, 1990. *Morb. Mort. Wkly. Rep.* 40: 57～60.

[14] Cheng, T. C. 1986. *General Parasitology*, 2d ed. New York: Academic Press.

[15] Childers, A. B., R. N. Terrell, T. M. Craig, T. J. Kayfus, and G. C. Smith. 1982. Effect of sodium chloride concentration, water activity, fermentation method and drying time on the viability of *Trichinella spiralis* in Genoa salami. *J. Food Protect.* 45: 816～819.

[16] Conroy, D. A. 1960. A note on the occurrence of *Giardia* sp. in a Christmas pudding. *Rev. Iber. Parasitol.* 20: 567～571.

[17] Craun, G. 1988. Surface water supplies and health. *J. Amer. Water Works Assoc.* 80: 40～52.

[18] Craun, G. F. 1979. Waterborne giardiasis in the United States: A review. *Amer. J. Pub. Hlth.* 69: 817～819.

[19] Current, W. L. 1988. The biology of Cryptosporidium. *ASM News.* 54 (11): 605～611.

[20] Current, W. L. 1987. *Cryptosporium*: Its biology and potential for environmental transmission. *CRC Crit. Rev. Environ. Cont.* 17: 21～51.

[21] D'Antonio, R. G., R. E. Winn, J. P. Taylor, T. L. Gustafson, W. L. Current, M. M. Rhodes, G. W. Gary, Jr., and R. A. Zajac. 1985. A waterborne outbreak of cryptosporidiosis in normal hosts. *Ann. Intern. Med.* 103: 886～888.

[22] Desmonts, G., J. Couvreur, F. Alison, J. Baudelot, J. Gerbeaux, and M. Lelong. 1965. Etude epidemiologique sur la toxoplasmose: De l'influence de la cuisson des viandes de boucherie sur la frequence de l'infection humaine. *Rev. Franc. Etudes Clin. Biol.* 10: 952～958.

[23] Duquesne, V., C. Auriault, F. Darcy, J. -P. Decavel, and A. Capron. 1990. Protection of nude rats against *Toxoplasma* infection by excreted-secreted antigen-specific helper T cells. *Infect. Immun.* 58: 2120～2126.

[24] Fayer, R., and B. L. P. Ungar. 1986. *Cryptosporidium* spp. and cryptosporiodiosis. *Microbiol. Rev.* 50: 458～483.

[25] Fayer, R., and J. P. Dubey. 1985. Methods for controlling transmission of protozoan parasites from meat to man. *Food Technol.* 39 (3): 57～60.

[26] Fayer, R. 1982. Other protozoa: *Eimeria*, *Isospora*, *Cystoisopora*, *Besnoitia*, *Hammondia*. *Frenkelia*,

Sarcocystis, *Cryptosporidium*, *Encephalitozoon*, and *Nosema*. In *CRC Handbook Series in Zoonosis*, ed. J. H. Steele, 187～197. Boca Raton, FL: CRC Press.

[27] Fayer, R. 1975. Effects of refrigeration, cooking and freezing on *Sarcocystis* in beef from retail food stores. *Proc. Helm. Soc. Wash.* 42: 138～140.

[28] Feldman, H. A., and L. T. Miller. 1956. Serological study of toxoplasmosis prevalence. *Amer. J. Hyg.* 64: 320～335.

[29] Gammon, D. L., J. D. Kemp, J. M. Edney, and W. Y. Varney. 1968. Salt, moisture and aging time effects on the viability of *Trichinella spiralis* in pork hams and shoulders. *J. Food Sci.* 33: 417～419.

[30] Gangarosa, E. J., and J. A. Donadio. 1970. Surveillance of foodborne disease in the United States. *J. Infect. Dis.* 62: 354～358.

[31] Grabda, J., and J. W. Bier. 1988. Cultivation as an estimate for infectivity of larval *Anisakis simplex* from processed herring. *J. Food Protect.* 51: 734～736.

[32] Hayes, E. B., T. D. Matte, T. R. O'Brien, T. W. McKinley, G. S. Logsdon, J. B. Rose, B. L. P. Ungar, D. M. Word, P. F. Pinsky, M. L. Cummings, M. A. Wilson, E. G. Long, E. S. Hurwitz, and D. J. Juranek. 1989. Large community outbreak of cryptosporiodiosis due to contamination of a filtered public water supply. *N. Engl. J. Med.* 320: 1372～1376.

[33] Higashi, G. I. 1985. Foodborne parasites transmitted to man from fish and other aquatic foods. *Food Technol.* 39: (3): 69～74, 111.

[34] Hilwig, R. W., J. D. Cramer, and K. S. Forsyth. 1978. Freezing times and temperatures required to kill cysticerci of *Taenia saginata* in beef. *Vet. Parasitol.* 4: 215～219.

[35] Jackson, G. J. 1990. Parasitic protozoa and worms relevant to the U. S. *Food Technol.* 44 (5): 106～112.

[36] Jackson, G. J. 1975. The "new disease" status of human anisakiasis and North American cases: A review. *J. Milk Food Technol.* 38: 769～773.

[37] Jackson, G. J., J. W. Bier, W. L. Payne, T. A. Gerding, and W. G. Knollenberg. 1978. Nematodes in fresh market fish of the Washington, D. C. area. *J. Food Protect.* 41: 613～620.

[38] Jackson, M. H., and W. M. Hutchison. 1989. The prevalence and source of *Toxoplasma* infection in the environment. *Adv. Parasitol.* 28: 55～105.

[39] Jacobs, L. 1962. Parasites in food. In *Chemical and Biological Hazards in Food*, ed. J. C. Ayres et al., 248～266. Ames: Iowa State University Press.

[40] Jacobs, L., J. S. Remington, and M. L. Melton. 1960. A survey of meat samples from swine, cattle, and sheep for the presence of encysted *Toxoplasma*. *J. Parasitol.* 46: 23～28.

[41] Joiner, K. A., S. A. Furhman, H. M. Miettinen, L. H. Kasper, I. Mellman. 1990. *Toxoplasma gondii*: Fusion competence of parasitophorous vacuoles in Fc receptor-transfected fibroblasts. *Science* 249: 641～646.

[42] Karl, H. 1988. Vorkommen von Nematoden in Konsumfischen. *Verfah. Feststel. Abtoetung. Rundsch. Fleisch. Lebensmittelhyg.* 40: 198～199.

[43] Karl, H., and M. Leinemann. 1989. Ueber lebensfaehigkeit von Nematodenlarven (*Anisakis* sp.) in gefrosteten Heringen. *Arch. Lebensmittelhyg.* 40: 11～16.

[44] Kean, B. H., A. C. Kimball, and W. N. Christenson. 1969. An epidemic of acute toxoplasmosis. *J. Amer. Med. Assoc.* 208: 1002～1004.

[45] Kirkpatrick, C. E., and C. E. Benson. 1987. Presence of *Giardia* spp. and absence of *Salmonella* spp. in New Jersey muskrats (*Ondatra zibethicus*). *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 1790～1792.

[46] Kliks, M. M. 1983. Anisakiasis in the western United States; Four new case reports from California. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 32: 526～532.

[47] Kolata, G. 1985. Testing for trichinosis. *Science* 227: 621, 624.

[48] Korich, D. G., J. R. Mead, M. S. Madore, N. A. Sinclair, and C. R. Sterling. 1990. Effects of ozone, chlorine dioxide, chlorine, and monochloramine on *Cryptosporidium parvum* oocyst viability. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1423～1428.

[49] Kotula, A. W., A. K. Sharar, E. Paroczay, H. R. Gamble, K. D. Murrell, and L. Douglass. 1990. Infectivity of *Trichinella spiralis* from frozen pork. *J. Food Protect.* 53: 571～573.

[50] Kotula, A. W., P. J. Rothenberg, J. R. Burge, and M. B. Solomon. 1988. Distribution of *Trichinella spiralis* in the diaphragm of experimentally infected swine. *J. Food Protect.* 51: 691～695.

[51] Kotula, A. W. 1983. Postslaughter control of *Trichinella spiralis*. *Food Technol.* 37 (3): 91～94.

[52] Lopez, C. E., D. D. Juranek, S. P. Sinclair, and M. G. Schultz. 1978. Giardiasis in American travelers to Madeira Island, Portugal. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 27: 1128～1132.

[53] MacKenzie, W. R., N. J. Hoxie, M. E. Proctor, M. S. Gradus, K. A. Blair, D. E. Peterson, J. J. Kazmierczak, D. G. Addiss, K. R. Fox, J. B. Rose, and J. P. Davis. 1994. A massive outbreak in Milwaukee of cryptosporidium infection transmitted through the public water supply. *N. Engl. J. Med.* 331: 161～167.

[54] Margolis, L. 1977. Public health aspects of "codworm" infection: A review. *J. Fish. Res. Bd. Canada* 34: 887～898.

[55] Marquardt, W. C., and R. S. Demaree. 1985. *Parasitology*. New York: Macmillan.

[56] Myers, B. J. 1979. Anisakine nematodes in fresh commercial fish from waters along the Washington, Oregon and California coasts. *J. Food Protect.* 42: 380～384.

[57] Myers, B. J. 1976. Research then and now on the anisakidae nematodes. *Trans. Amer. Microscop. Soc.* 95: 137～142.

[58] Ongerth, J. E., and H. H. Stibbs. 1987. Identification of *Cryptosporidium* oocysts in river water. *Appl. Environ. Microbiol.* 53: 672～676.

[59] Osterholm, M. T., J. C. Forfang, T. L. Ristinen, A. G. Daan, J. W. Washburn, J. R. Godes, R. A. Rude, and J. G. McCullough. 1981. An outbreak of foodborne giardiasis. *N. Engl. J. Med.* 304: 24～28.

[60] Petersen, L. R., M. L. Cartter, and J. L. Hadler. 1988. A foodborne outbreak of *Giardia lamblia*. *J. Infect. Dis.* 157: 846～848.

[61] Piekarski, G. 1989. *Medical Parasitology*. New York: Springer-Verlag.

[62] Plorde, J. J. 1984. Sporozoan infections. In *Medical Microbiology: An Introduction to Infectious Diseases*, ed. J. C. Sherris, K. J. Ryan, C. G. Ray, J. J. Plorde, L. Corey, and J. Spizizen, 469～483. New York: Elsevier.

[63] Rendtorff, R. C. 1954. The experimental transmission of human intestinal protozoan parasites. Ⅱ. *Giardia lamblia* cysts given in capsules. *Amer. J. Hyg.* 59: 209～220.

[64] Riemann, H. P., M. E. Meyer, J. H. Theis, G. Kelso, and D. E. Behymer. 1975. Toxoplasmosis

in an infant fed unpasteurized goat milk. *J. Pediat.* 87: 573～576.

[65] Rodrick, G. E., and T. C. Cheng. 1989. Parasites: Occurrence and significance in marine animals. *Food Technol.* 43 (11): 98～102.

[66] Rommel, M., and A. -O. Heydorn. 1972. Beiträge zum Lebenszyklus der Sarkosporidien. Ⅱ. *Isospora hominis* (Railliet and Lucet, 1891) Wenyon, 1923, eine Dauerform der Sarkosporidien des Rindes und des Schweins. *Berl. Munchen. Tierarztl. Wochens.* 85: 143～145.

[67] Rosset, J. S., K. D. McClatchey, G. I. Higashi, and A. S. Knisely. 1982. *Anisakis* larval type I in fresh salmon. *Amer. J. Clin. Pathol.* 78: 54～57.

[68] Sacks, J. J., R. R. Roberto, and N. F. Brooks. 1982. Toxoplasmosis infection associated with raw goat's milk. *J. Amer. Med. Assoc.* 248: 1728～1732.

[69] Salata, R. A., A. Martinez-Palomo, L. Canales, H. W. Murray, N. Trevino, and J. I. Ravdin. 1990. Suppression of T-lymphocyte responses to *Entamoeba histolytica* antigen by immune sera. *Infect. Immun.* 58: 3941～3946.

[70] Schantz, P. M. 1983. Trichinosis in the United States—1947～1981. *Food Technol.* 37 (3): 83～86.

[71] Sherwood, D., K. W. Angus, D. R. Snodgrass, and S. Tzipori. 1982. Experimental cryptosporidiosis in laboratory mice. *Infect. Immun.* 38: 471～475.

[72] Smith, J. L. 1993. Documented outbreaks of toxoplasmosis: Transmission of *Toxoplasma gondii* to humans. *J. Food Protect.* 56: 630～639.

[73] Smith, P. D. 1989. *Giardia lamblia*. In *Parasitic Infections in the Compromised Host*, ed. P. D. Walzer and R. M. Genta, 343～384. New York: Marcel Dekker.

[74] Smith, H. V., R. W. A. Girdwood, W. J. Patterson, R. Hardie, L. A. Green, C. Benton, W. Tulloch, J. C. M. Sharp, and G. I. Forbes. 1988. Waterborne outbreak of cryptosporiodiosis. *Lancet* ii: 1484.

[75] Sole, T. D., and N. A. Croll. 1980. Intestinal parasites in man in Labrador, Canada. *Amer. J. Trop. Med. Hyg.* 29 (3): 364～368.

[76] Sterling, C. R., and M. J. Arrowood. 1986. Detection of *Cryptosporidium* sp. infections using a direct immunofluorescent assay. *Ped. Infect. Dis.* 5: 139～142.

[77] Sterling, C. R., K. Seegar, and N. A. Sinclair. 1986. *Cryptosporidium* as a causative agent of traveler's diarrhea. *J. Infect. Dis.* 153: 380～381.

[78] Todd, E. C. D. 1989. Foodborne and waterborne disease in Canada—1983 annual summary. *J. Food Protect.* 52: 436～442.

[79] Tzipori, S. 1988. Cryptosporidiosis in perspective. *Adv. Parasitol.* 27: 63～129.

[80] U. S. Department of Agriculture. 1982. USDA advises cooking pork to 170 degrees Fahrenheit throughout. News release, USDA, Washington, DC.

[81] Zimmermann, W. J. 1983. An approach to safe microwave cooking of pork roasts containing *Trichinella spiralis*. *J. Food Sci.* 48: 1715～1718, 1722.

[82] Zimmermann, W. J., and P. J. Beach. 1982. Efficacy of microwave cooking for devitalizing trichinae in pork roasts and chops. *J. Food Protect.* 45: 405～409.

[83] Zimmermann, W. J., D. G. Olson, A. Sandoval, and R. E. Rust. 1985. Efficacy of freezing in eliminating infectivity of *Trichinella spiralis* in boxed pork products. *J. Food Protect.* 48: 196～199.

27. 真菌毒素

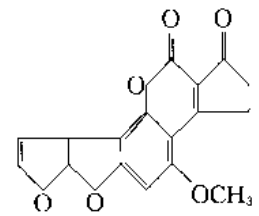
有很多真菌可以产生称为“真菌毒素”的有毒物质。有些毒素是可以诱导基因突变和致癌的物质，有些能显示特定器官的毒性，而有些具有其它的毒性机理。虽然许多真菌毒素对人类的真实毒性还没有被证实，但是这些物质在试验动物身上和它们在体外分析系统中的行为几乎可以说明它们对于人类有真正和潜在的毒性。至少有 14 种真菌毒素是致癌性的，其中黄曲霉毒素是致癌力最强的毒素[58]。现在人们普遍认为，约有 93%的致突变物质是致癌性的。对于真菌毒素，微生物分析系统揭示了致癌性和致突变性之间有 85%的对应关系[58]。

真菌毒素是由次级代谢产生的。真菌以及其它生物的初级代谢产物是那些对于生长是必需的物质。次级代谢产物是在指数生长期结束时生成的，它们对于产生它们的微生物的生长或代谢没有显著的意义。一般来说，毒素是在初级代谢前驱物质（例如氨基酸、醋酸、丙酮酸等）积累量很大的时候生成的。真菌毒素的合成是真菌降低代谢前驱物质库水平的方式之一，这时表示真菌代谢中已经不再需要这些物质了。

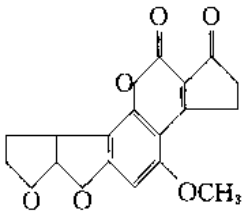
有关食品中真菌毒素的测定，可以参阅第四部分 11 和参考文献[42]。

27.1 黄曲霉毒素

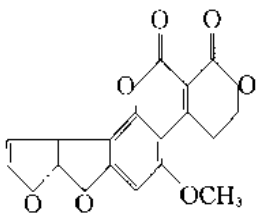
黄曲霉毒素是人们研究得最多的真菌毒素。知晓它们存在的时间可以追溯到 1960 年，当时英国有 100 000 多只火鸡幼禽在食用了从非洲和南美洲进口的花生粉之后全部死亡。人们从有毒的饲料中分离出了黄曲霉（*Aspergillus flavus*）和这种霉菌产生的一种毒素，被定名为黄曲霉毒素（英文名称来源：*Aspergillus flavus* toxin→A-fla-toxin）。在对这种有毒物质的研究中，人们发现了下述 4 种物质：



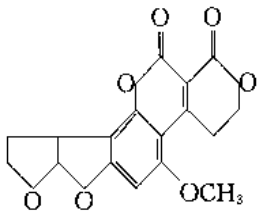
B_1



B_2



G_1



G_2

后来经过证实，寄生曲霉（*A. parasiticus*）也能产生黄曲霉毒素。此外另一种曲霉——模式曲霉（*A. nominus*）也能产生黄曲霉毒素[32]。这些化合物是香豆素被高度取代之后的产物，已知的密切相关的毒素至少有18种。黄曲霉毒素B_1（AFB_1）可以由所有黄曲霉毒素阳性菌株产生，它是在所有黄曲霉毒素中毒性最强的物质。AFM_1是AFB_1羟基化的衍生产物，可以作为代谢产物出现在乳汁、尿液和粪便中[21]。AFL、$AFLH_1$、AFQ$_1$和AFP_1都是从AFB_1衍生出来的。AFB_2是AFB_1在2，3-位脱水后的形式，AFG_2是AFG_1在2，3-位脱水后的形式。毒性最强的6种黄曲霉毒素的毒力顺序如下：$B_1>M_1>G_1>B_2>M_2\neq G_2$[4]。在紫外光下观察时，可以见到这些毒素的6种荧光颜色：

B_1、B_2——蓝色
G_1　　绿色
G_2——绿-蓝色
M_1　　蓝-紫色
M_2——紫色

它们是多亚酮基次级代谢产物，它们的碳架来自于乙酸和丙二酸。

AFB_1合成途径的部分步骤被认为如下：醋酸→降苏罗尼酸→averantin→averufanin→奥弗尼红素→乙酸杂酰半缩醛→杂色曲霉素A→柄曲霉素→*O*-甲基柄曲霉素→AFB_1。杂色曲霉素A是这个途径中含有必需C_2—C_3双键的化合物。

27.1.1　生长和产毒的条件

黄曲霉和寄生曲霉的25份分离物在2℃、7℃、41℃或46℃的麦芽汁琼脂上8d内未见产生黄曲霉毒素，在7.5℃或40℃以上即使其它条件都是最适宜的情况下也未见产生毒素[51]。在另一份研究中采用了萨布罗琼脂，这时黄曲霉和寄生曲霉的最佳生长条件为：33℃、pH5.0和A_w0.99[28]、在15℃下，它们可以在A_w0.95下生长，但不能在A_w0.90下生长，而在27℃和33℃下，在A_w0.85下只是略有生长。许多研究者发现，毒素产生的最适温度在24～28℃之间。在一次研究中发现，寄生曲霉的最适生长温度为35℃，但是毒素产生水平最高时的温度为25℃[54]。

在24℃或更高的温度下，在玉米中产生AFB_1和AFB_2的限制湿含量为17.5%，所产毒素水平为50ng/g[67]。在13℃下无毒素产生。总的来说，毒素产生的A_w范围在0.93～0.98之间，不同报道中的极限A_w在0.71～0.94之间[39]。在另一次研究中，在A_w为0.83和10℃条件下，未检出寄生曲霉能产生AFB_1[41]。在A_w为0.94时产毒的最适温度为24℃（图27.1）。在A_w为0.83和含有蔗糖的麦芽汁琼脂上黄曲霉可以生长但不产生毒素。有数位研究者观察到在最适温度下，大米能支持高水平黄曲霉毒素生成，但是在5℃温度下不论是大米还是切达干酪中都未见毒素生成[45]。

总的来说，控制这些真核微生物生长和毒素生成的最高和最低参数并不易确定，这在一定程度上是因为它们在自然界的生态差别很大，另一方面是它们真核状态的不同。很显然它们在生长过程中可以不产生毒素。

与AFB_1相比，AFG_1是在较低的生长温度下生成的，虽然有些研究者发现在30℃左右产生的AFB_1比AFG_1多，而另一些研究者发现这种条件下两者的生成量是相同的。对

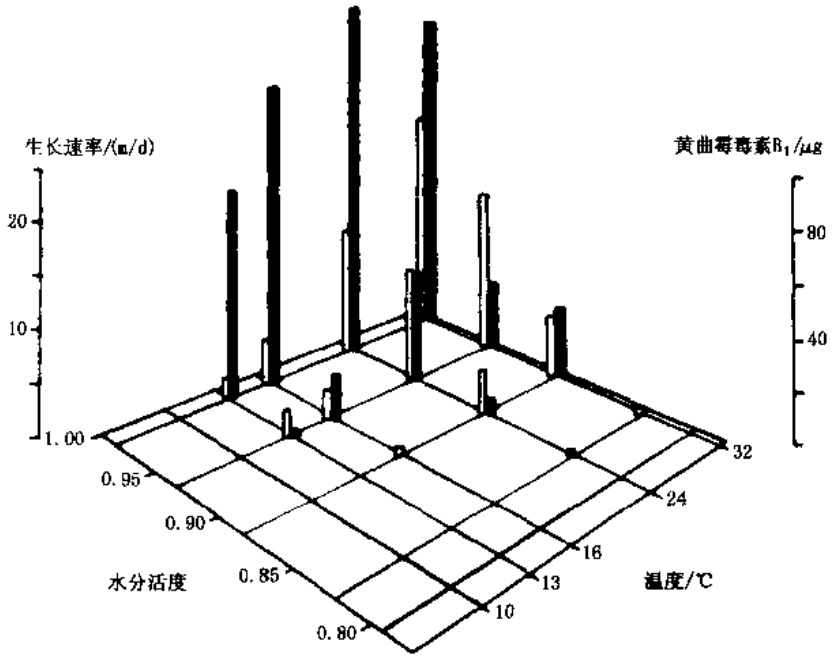


图 27.1 在不同水分活度和温度的麦芽汁-甘油琼脂上黄曲霉的生长和黄曲霉毒素 B_1 的生成[41]

注：白色立柱 生长速率；黑色立柱 -AFB₁ 平均生成水平。

于黄曲霉和寄生曲霉来说，前者一般只产生 AFB 和 AFG[17]。通气有助于黄曲霉毒素的合成，在天然基质（例如大米、玉米、大豆等）中的生成量可达 2mg/g[17]。当基质中含有适当水平的 Zn^{2+} 时，毒素的生成量可达 200～300mg/L。黄曲霉释放 AFB_1 似乎需要一种消耗能量的输送系统。

27.1.2 毒素生成与食品污染

关于食品中产生黄曲霉毒素的问题，现在已经证实当产毒培养物存在和储存在 15℃、20℃和 30℃时，新鲜牛肉、腌肉和熏肉中产生了毒素[18]，当腌制温度接近 30℃时，在乡村腌制的火腿中也存在毒素，但是当腌制温度在 15℃以下或相对湿度大于 75%时，则未产生毒素[19]。他们还发现黄曲霉毒素在多种食品中存在，包括乳品、啤酒、可可、葡萄干、大豆粉等（见下述）。在 25℃进行香肠发酵时，在 10d 和 18d 后分别产生了 160mg/kg 和 426mg/kg AFG_1，在这种情况下 AFG_1 的生成量要比 AFB_1 多 10 倍[13]。储存在 22℃条件下的全黑麦和全小麦面包、丹麦太尔西特干酪和苹果汁中都产生过黄曲霉毒素。他们还发现寄生曲霉在存放于室温下的 3 个月期的切达干酪表层产生了黄曲霉毒素[36]，保存在 12.8℃下 1 周后的砖形干酪上也产生了黄曲霉毒素，但是黄曲霉未产生毒素[54]。据发现在 63 份商品花生酱样品中有 3 份含有 AFB_1，其含量水平不到 5ng/g[56]。在 5 年时间内美国弗吉尼亚州检测的约 500 份玉米和小麦样品中，在每个收获季节的玉米样品中约有 25%含有毒素，其中 18%～61%样品的毒素含量高于 20ng/g，有 5%～29%样品

的含毒素量超过 100ng/g[56]。这 5 年期间检测的平均毒素含量为 21～137ng/g（表 27.1）。黄曲霉毒素、玉米赤霉烯酮和赭曲霉毒素在小麦样品中均未被检出。在 1988 年干旱年份，美国中西部地区的一些州生产的玉米中黄曲霉毒素的含量增加，这个年份 6 月和 7 月的降水量不足 50mm。约有 30%的样品中含有超过 20ng/g 的毒素，而正常降雨年份的毒素含量只有 2～3ng/g[57]。

有人对 5℃和 25℃循环下稻米和干酪中黄曲霉毒素的产生情况进行过研究。寄生曲霉在这样的循环温度下比在 15℃、18℃或 25℃产生的毒素多，而黄曲霉在这些条件下产生的毒素较少[45]。但是在切达干酪上，在这种循环温度下产生的黄曲霉毒素比在 25℃下产生的少，这些研究者还注意到如果将干酪存放在远远低于产生毒素的最适温度下，这种干酪并不是产生黄曲霉毒素的良好基质。

除了上述食品之外，黄曲霉毒素已经被证实可以在很多种食品产品中生成。在最适生长条件下，24h 之内可以检测到某些毒素的生成，其它毒素可以在 4～10d 内被检测出[24]。在花生上，Hesseltine[27]观察到了下述情况：

①霉菌生长和黄曲霉毒素生成主要是在花生出土后的储存过程中出现的。

②在一批含毒素的花生中，只有较少的颗粒含有毒素，能否检测出毒素与被挑选的样品量有关，样品量较多（例如 1kg），检出的可能性较大。

③即使在 1 颗花生之内，毒素含量的变化也很大。

④影响黄曲霉毒素产生的两个最重要的因素是湿度和温度。

美国食品与药物管理局制定的食品中黄曲霉毒素的允许量标准如下：食品、饲料、巴西坚果、花生、花生制品和阿月浑子果为 20ng/g，乳品为 0.5ng/g[53]。

27.1.3　相对毒性和作用方式

为了评价黄曲霉毒素的致突变能力，考虑哺乳动物对它们的代谢系统是至关重要的，尤其是对 AFB_1 的代谢。考虑它们与核酸结合的能力也是十分重要的，尤其是与 DNA 的结合[40]。虽然 AFB_1 对所有的 DNA 都有影响，但是与细胞核中的 DNA 相比，AFB_1 能够更好地与肝脏线粒体 DNA 结合。除了核酸之外，细胞中的其它大分子也可能是黄曲霉毒素的结合位点。黄曲霉毒素分子中负责致突变的位点是二氢呋喃基呋喃部分中的 C_2—C_3 双键。它还原成 2，3-二氢 AFB_2 形式时，其致突变能力降低了 200～500 倍[58]。在与 DNA 结合之后，黄曲霉毒素诱导的点突变是基因的主要遗传性伤害，但是构架漂移突变也是可能出现的。采用阿麦斯分析法分析时，2，3-二丁基-4-羟基茴香醚（BHA）和丁基羟基甲苯（BHT）可以使 AFB_1 的致突变能力提高 1 倍，而没食子酸丙酯的这种增强效果要低得多，但是这些物质在动物体内是否有增强作用，还不清楚[53]。

AFB_1 经过口服对老鼠致死的 LD_{50} 值为 1.2mg/kg，AFG_1 的这个数值为 1.5～2.0mg/kg[10]。不同动物对黄曲霉毒素的敏感性列在表 27.2 中。幼龄小鸭和幼龄鲑鱼是最敏感的，其次是鼠和其它动物。多数种类的敏感动物在摄入了毒素之后 3d 内死亡，在死后的解剖中发现它们的肝脏有总体性损伤，这表明黄曲霉毒素是致肝脏癌症的物质[21]。黄曲霉毒素对于幼龄和雌性动物的毒性比对较成熟和雄性动物的毒性强。饲喂低蛋白和导致硬化的食物可以增强这种毒性。

表 27.1　美国弗吉尼亚州 1976—1980 年戴恩特玉米中黄曲霉毒素含量[55]

黄曲霉毒素量[a]（ng/g）	由联邦谷物检测服务处自运输车取样										由统计报道服务处自收获场所取样			
	1976		1977		1978		1979		1980		1978		1979	
	样品数	比例/%	样品数	比例/%	样品数	比例/%	样品数	比例/%	样品数	比例/%	样品数	比例/%	样品数	比例/%
未检测	77	63	52	51	63	64	81	71	18	18	79	88	93	79
<20	13	10	17	17	10	10	13	11	20	20	2	2	9	8
20～100	21	17	18	18	21	21	8	7	32	32	5	6	7	6
101～500	9	7	10	10	5	5	10	9	26	26	4	4	7	6
501～1000	1	1	1	1			2	2	1	1	—	—	—	—
>1000	2	2	3	3			—	—	2	2			1	1
总计	123		101		99		114		99		90		117	
发生率/%		37		49		36		29		82		12		24
≥20		27		32		26		18		61		10		13
>100		10		14		5		11		29		4		7
所有样品平均水平		48		91		21		34		137		13		36
阳性样品平均水平		130		187		58		118		167		110		176

表 27.2　　单用黄曲霉毒素 B_1 致死剂量的比较[71]

动　物	年龄（或体重）	性别	途径	LD_{50}（mg·kg）
小鸭	1d	雄	口服	0.37
	1d	雄	口服	0.56
鼠	1d	雄，雌	口服	1.0
	21d	雄	口服	5.5
	21d	雌	口服	7.4
	100g	雄	口服	7.2
	100g	雄	静脉注射	6.0
	130g	雌	口服	17.9
大鼠	30d	雄	口服	10.2
几内亚猪	成年	雄	静脉注射	约 1
兔	乳期	雄，雌	静脉注射	约 0.5
狗	成年	雄，雌	静脉注射	约 1
	成年	雄，雌	口服	约 0.5
鲑鱼	100g	雄，雌	口服	约 0.5

实验证明，黄曲霉毒素对人体是致癌的。来自黄曲霉毒素中毒的症状有泰国的 EFDV 综合征、泰国和新西兰的雷亥综合征[1,9,13]，以及乌干达儿童中的急性干细胞瘤。在这后一种病症中，在急性肝病致死者体内发现的肝脏组织变化与用黄曲霉毒素饲喂猴子观察到的变化相同，这些发现有力地证明了黄曲霉毒素的病因学说[52]。有两位常与纯黄曲霉毒素接触的研究者患上了结肠癌[19]。在人体不存在 B 型肝炎病毒慢性感染的情况下，尚未发现有任何真菌毒素与特定的癌症有关联[61]。虽然某些真菌毒素对多种幼龄动物的毒性极大，但是有人认为它们对于人类的毒性是过于夸大了。

27.1.4　降解

玉米中的 AFB_1 和 AFB_2 可以用酸式亚硫酸盐降解。当干燥的无花果中混入 250ng/g AFB_1 时，在经过一些措施处理后的结果如下：1%亚硫酸氢钠处理 72h 后，降低了 28.2%；0.2% H_2O_2（在添加亚硫酸氢钠之前处理 10min），降低了 65.5%；在 45～65℃加热 1h 后降低了 68.4%；紫外线照射后降低了 45.7%[2]。将含有黄曲霉毒素的棉籽用 NH_4 处理再饲喂给奶牛时，牛乳中的 AFB_1 和 AFM_1 含量要比未处理情况下的含量低[28]。自然污染后含有 1 600mg/kg 黄曲霉毒素的黄色戴恩特玉米在用 3% NaOH 于 100℃处理 4min 后，再经过进一步加工和油炸，其中的 99%黄曲霉毒素被破坏[12]。

27.2　链格孢毒素

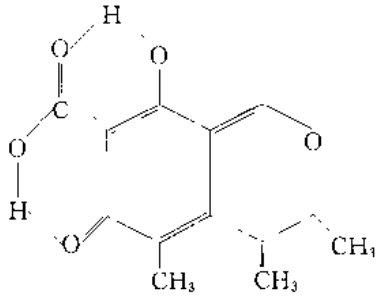
有数种链格孢（*Alternaria*）[包括柠檬链格孢（*A. citri*）、交链格孢（*A. alternata*）、

茄生链格孢（*A. solani*）和细链格孢（*A. tenuissima*）]能够产生毒素物质，这些毒素可以在苹果、番茄、黑莓、谷物和其它食品中出现[59,60]。它们所产生的毒素包括交链格孢醇、交链格孢醇单甲酯、细链格孢烯、细链格孢酮酸和链格孢毒素 I[59]。在苹果和番茄切片或破碎的黑莓中于 21℃下培养 21d 后，数种链格孢能够产生上述各种毒素，其产生水平达 137mg/100g[59]。在另一项研究中发现，细链格孢酮酸是番茄中产生的主要毒素，其生成水平高达 13.9mg/100g，在甜橙和柠檬上于室温下培养 21～28d 后，柠檬链格孢产生了细链格孢酮酸、交链格孢醇和交链格孢醇单甲酯，这些产物的平均浓度为 1.15～2.66mg/100g[60]。

在对阿根廷 150 份葵花籽样品的分析中发现，85%含有交链格孢醇（平均 187μg/kg），47%含有交链格孢醇单甲酯（平均 194μg/kg），65%含有细链格孢酮酸（平均 6，692μg/kg）[15]。在经过交链格孢发酵 28d 之后，再将葵花籽的油脂与籽肉分开，在油脂中检出了 1.6%～2.3%细链格孢酮酸和 44%～45%交链格孢醇单甲酯，未检出交链格孢醇，但在籽肉部分中未检出这些毒素[15]。有一株交链格孢产生了葡柄霉毒素Ⅲ，根据阿麦斯法分析，这种毒素是致突变的[18]。有关链格孢毒素更详细的资料，请参阅文献[13]。

27.3 橘霉素

橘霉素是由橘青霉（*Penicillium citrinum*）、鲜绿青霉（*P. viridicatum*）和其它霉菌产生的。它已经从抛光的大米、霉变的面包、乡村腌制的火腿、小麦、燕麦、黑麦和其它类似的产品中被提取出来。在长波紫外线照射下，它呈现柠檬黄色荧光。它是已知的致癌物质。在从乡村腌制的火腿中分离的 7 支鲜绿青霉菌株中，所有菌株在马铃薯汁葡萄糖培养液和乡村腌制火腿中于 20～30℃下培养 14d 后都产生了橘霉素，但是在 10℃下未产生橘霉素[72]。这些霉菌在 10℃下的生长是不良的。



橘霉素

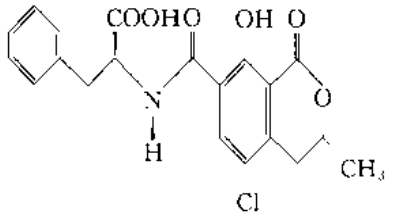
德国在霉变的食品中检测出了橘霉素，橘霉素和其它真菌毒素一起也可以在合成培养基中生成[54]。

虽然在可可和咖啡豆中发现了橘霉素产生菌，但是这种真菌毒素以及其它毒素未见在这些食品基质中生成。其明显原因之一是咖啡因抑制了橘青霉的橘霉素合成。对橘霉素合成的抑制似乎是相当专一性的，因为这些霉菌的生长受咖啡因的影响很小[51]。

27.4 赭曲霉毒素

赭曲霉毒素至少包括7种结构相关的一组次级代谢产物，其中赭曲霉毒素A是已知毒性最强的物质。赭曲霉毒素B是赭曲霉毒素A及赭曲霉毒素C脱氯后的产物，它不会在自然界自然存在。赭曲霉毒素A可以由很多种真菌产生，包括赭曲霉（*A. ochraceus*）、洋葱曲霉（*A. alliaceus*）、*A. ostianus*、*A. mellus* 和其它种曲霉。在青霉中产生赭曲霉毒素A的有：鲜绿青霉（*P. viridicatum*）、圆弧青霉（*P. cyclopium*）、变幻青霉（*P. variable*）等。

赭曲霉毒素A在30℃和A_w为0.95左右的条件下生成量最多[4]。在家禽饲料温度为30℃的条件下，有助于赭曲霉产生赭曲霉毒素A的最低水分活度A_w为0.85[4]。这种毒素给老鼠口服的LD_{50}值为20～22mg/kg，它对肝脏和肾脏都有毒害作用。



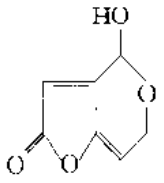
赭曲霉毒素A

这种真菌毒素被发现存在于玉米、干豆、可可豆、大豆、燕麦、大麦、柠檬类水果、巴西坚果、霉变的烟草、乡村腌制的火腿、花生、咖啡豆和其它类似的产品中。将从乡村腌制的火腿中分离的两株赭曲霉接种到稻米、脱脂花生中和接种到乡村腌制的火腿中时，都能产生赭曲霉毒素A和赭曲霉毒素B[22]。在培养21d后，有三分之二的毒素会渗透至基质内0.5cm处，而其余三分之一仍留在菌丝层内。从乡村腌制的火腿中分离的6株鲜绿青霉菌株中，未见有产生赭曲霉毒素的菌株。在关于化学试剂对霉菌生长和产毒能力影响的研究中，在pH4.5下培养两株赭曲霉毒素A产生菌株时，发现下述4种物质的抑制能力依次如下：山梨酸钾＞丙酸钠＞对羟基苯甲酸甲酯＞亚硫酸氢钠；而在pH5.5条件下，效果较好的两种化合物是对-羟基苯甲酸甲酯和山梨酸钾[56]。如同其它真菌毒素一样，赭曲霉毒素A是耐热的。在一次研究中，煮熟的法芭豆中赭曲霉毒素A的最高破坏率只有20%，所以这些研究者认为在正常的烹调过程中赭曲霉毒素A不会被破坏[70]。在紫外光照射下，赭曲霉毒素A的荧光呈微绿色，而赭曲霉毒素B荧光呈蓝色。这些毒素在猴子的肾脏细胞内会诱导异常的有丝分裂。

27.5 棒曲霉素

棒曲霉素（又称为珊瑚青霉毒素和扩展青霉毒素），它是由多种青霉（*Penicillium*）、一些曲霉（*Aspergillus*）和丝衣霉（*Byssochlamys*）产生的。产生棒曲霉素的青霉包括：珊瑚形青霉（*P. claviforme*）、扩展青霉（*P. expansum*）、细小青霉（*P. patulum*）；产生棒曲霉素的曲霉包括：棒曲霉（*A. clavatus*）、土曲霉（*A. terreus*）和其它曲霉；产生棒曲

霉素的丝衣霉包括：雪白丝衣霉（*B. nivea*）、赤褐丝衣霉（*B. fulva*）[17]。



棒曲霉素

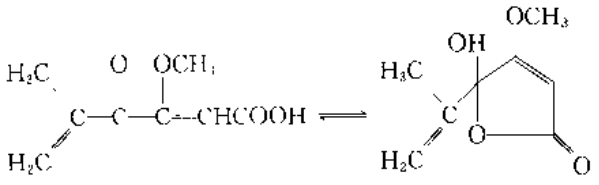
棒曲霉素的生物学性质类似于青霉酸。某些棒曲霉素产生菌能在2℃以下产生这种毒素[45]。棒曲霉素在霉变的面包、香肠、水果（包括香蕉、梨、菠萝、葡萄和桃子）、苹果汁、苹果酒和其它产品中都有发现。在苹果汁中，曾被发现棒曲霉素的存在水平高达440μg/L，而在苹果酒中也达到过45mg/kg。在德国，棒曲霉素曾经与橘霉素、赭曲霉毒素A一起被从霉变的食品中检测出来[44]。

据报道，扩展青霉和细小青霉生长的最低水分活度值分别为0.83和0.81。在马铃薯葡萄糖培养液中，在12℃培养10d后，细小青霉和娄地青霉（*P. roqueforti*）产生了棒曲霉素，其中的毒素生成水平达到了1,033mg/kg[7]。在12℃的苹果汁中，雪白丝衣霉也产生了棒曲霉素，但是最高浓度是在21℃下20d后获得的，其中包括9d迟滞期[48]。棒曲霉素的第二高生成量是在30℃下获得的，而在37℃下获得的量要少得多。这些研究者证实，棒曲霉素的最佳生成温度低于最佳生长温度，以前Sommer等人的发现也是如此[56]。后来一些研究者培养扩展青霉时发现，这种菌产生毒素的温度范围在－20～5℃，而在30℃只产生少量的毒素。在美国乔治亚州检测的5份商品样品中，棒曲霉素水平为244～3993μg/L，平均为1902μg/L[50]。有人对苹果汁中棒曲霉素的总发生率进行了综述[26]。与空气相比，CO_2和N_2环境降低了棒曲霉素生成量。对于抑制棒曲霉素的生成来说，SO_2比山梨酸钾或苯甲酸钠更为有效[48]。

采用皮下注射时，棒曲霉素致死老鼠的LD_{50}值为15～25mg/kg，这种毒素可以在某些动物中诱发皮下肿瘤。棒曲霉素和青霉酸都可以结合到—SH和—NH_2基团上，形成共价连接的加合物，这样可以削弱它们的毒性。棒曲霉素能导致动物和植物细胞的染色体异常、也能导致癌症。

27.6 青霉酸

青霉酸具有类似于棒曲霉素的生物学性质。它可以由很多种霉菌产生，包括许多青霉（例如软毛青霉*P. puberulum*）以及赭曲霉群的一些成员。圆弧青霉（*P. cyclopium*）是产青霉酸能力最强的真菌之一。据发现青霉酸存在于玉米、青豆和其它田野作物中，在实验室的瑞士干酪上也有生成。皮下注射时，它致死老鼠的LD_{50}值为100～300mg/kg，它也已经被证明可以诱发癌症。



青霉酸

在从意大利香肠中分离出的346份青霉培养物中，约有10%在液体培养基中产生了青霉酸，但是有5份接种到香肠中的菌株在70d后未能产生毒素[5-6]。在另一项研究中，从瑞士干酪中分离出了183株霉菌，其中87%是青霉，有93%霉菌可以在5℃下生长。青霉浸出物中有35%对鸡胚胎有毒性，从5.5%毒素混合物中检测出了青霉酸及棒曲霉素和黄曲霉毒素[6]。在33株真菌中，有4株在5℃培养6周后产生了青霉酸。

27.7 柄曲霉素

柄曲霉素在结构和生物学性质上与黄曲霉毒素类似，与黄曲霉毒素一样也能导致动物患肝癌。已知的柄曲霉素衍生物至少有8种。产生柄曲霉素的微生物有杂色曲霉（*Aspergillus versicolor*）、构巢曲霉（*A. nidulans*）、深红曲霉（*A. rugulosus*）和其它霉菌。采用腹膜注射法，柄曲霉素致死老鼠的LD_{50}值为60～65mg/kg。在紫外光照射下，柄曲霉素呈暗砖红色荧光。虽然柄曲霉素在天然产品中很少有发现，但它们已被发现存在于小麦、燕麦、荷兰干酪和咖啡豆中。与黄曲霉毒素相比，这些毒素的毒性较小。其毒性机理是抑制DNA的合成。

27.8 镰孢霉素

镰孢霉素是由一些镰孢霉（*Fusarium*）在玉米和其它谷物上产生的毒素，人和动物的某些疾病与食用了含有大量这些毒素的谷物和谷物制品有关。

产生这些真菌毒素的镰孢霉至少有3种：串珠镰孢霉（*F. moniliforme*）、分芽镰孢霉（*F. proliferatum*）和哈格美镰孢霉（*F. hygamai*）。串珠镰孢霉[以前称为轮丝镰孢霉（*F. Verticillioides*）和富士赤霉（*Gibberella fujikuroi*）]是最早被认识到与毒素有关的菌种，也是这3种霉菌中被研究得最多的菌种。在食道癌高发地区的人群中，串珠镰孢霉的出现率比在食道癌低发地区的出现率高[37]。

镰孢霉素至少有7种类型，4种B型（FB_1、FB_2、FB_3和FB_4）和至少3种A型（FA_1、FA_2和FA_3）。在这些毒素中较为重要的有FB_1、FB_2和FB_3，而其它几种都被认为不太重要或特征不明显。在这3种主要的毒素中，FB_1（也称为巨镰孢素）是产毒菌株中生成量最大的一种。例如培养在高温灭菌玉米上的9株串珠镰孢霉中，FB_1的生成量范围在960～2 350μg/g，而FB_2的生成量范围在120～320μg/g[50]。

镰孢霉素C也是由串珠镰孢霉产生的毒素，但是它显然不涉及到诱发肝癌的作用[25]。在阿麦斯试验中它显示出致突变活性，但是只是在肝部激活作用之后才有这种活性[69]。在培养基中，在pH<6.0的酸度下比在较高pH条件下产生的毒素量多，其最高生成量是在约28℃下2～6d后获得的[53]。从玉米中分离的串珠镰孢霉在玉米上生长时可以产生19～332μg/g的镰孢霉素C[20]。

27.8.1 生长和产生毒素

在探讨生长和毒素产生的最佳温度和酸度时发现，一株串珠镰孢霉在玉米培养基上

FB_1 的最高产率是在 20℃下 13 周以后获得的，这个产率为 17.9g/kg 干重[1]。这株霉菌的最适生长温度是 25℃，而不是 20℃，在这两种温度的生长平衡期是在第 4～6 周[1]。在同一项研究中，FB_1 的产生是在 2 周后开始的，而在 13 周后开始下降。总的来看，FB_1 生成的最佳温度和时间是在 25℃和第 7 周。据证实，有 1 株串珠镰孢霉可以在 25～30℃和 pH3～9.5 范围内良好地生长[68]。这株霉菌在同样的 pH 范围内于 37℃生长时状态不好。上述调节培养基酸度用的是磷酸[68]。串珠镰孢霉和分芽镰孢霉在 A_w 为 0.925 时都未见生成较多毒素[38]。前述生长在灭菌玉米培养基上的 1 株串珠镰孢霉在温度 25℃和水分活度 A_w 为 0.925、0.944、0.956 和 0.968 情况下，第 6 周时产生的 FB_1 含量 mg/kg 分别为 6.8、14.4、93.6 和 102.6[38]。

27.8.2 在玉米和饲料中的出现率

自从 20 世纪 80 年代中期以来，人们观察到了马脑白质软化症、猪肺水肿和人食道癌多发生在世界上谷物类食品中含高水平镰孢霉素的地区[73]。例如在南非，人食道癌较多发生在特兰斯凯地区，这个地区的谷物中 FB_1 和 FB_2 的含量很高。镰孢霉素的出现是由于几种镰孢霉的存在，尤其是串珠镰孢霉。在中国，食道癌高发县区镰孢霉素 FB_1 的出现率比低发县区的出现率要高 1 倍，但是这个差别并没有统计意义[73]。除了镰孢霉素之外，在食道癌高发地区还在玉米中发现了单端孢烯（主要是脱氧瓜萎镰孢醇）。来自 6 个国家的玉米和一些玉米制品中 FB_1 的出现率和含量概括在表 27.3 中。含量最高的是来自南非特兰斯凯地区的玉米，这个地区是食道癌高发地区。这 6 份样品中的 FB_1 含量范围在 3 020～117 520ng/g，平均含量为 53 740ng/g[63]。这个水平超过了那些来自同一个总地区的 12 份霉变玉米样品中发现的平均含量 23 900ng/g[47]。总的来说，玉米粉中发现的 FB_1 水平较低，而玉米片中的水平要高一些（见表 27.3）。

表 27.3　　来自不同国家的玉米和玉米制品中镰孢霉素 B_1 出现率与含量

产　品	国　家	样品毒素含量	样品总数	镰孢霉素含量 /ng	平均含量 (ng/g)	参考文献
玉米粉	瑞士	34	55	0～790	260	44
玉米粉	南非	10	18	0～190	125	64
玉米粉	美国	10	10	105～2545	601	64
玉米粉 片混合物	美国	10	17	200～15600		43
玉米片	瑞士	7	7	0～110	85	44
玉米片	南非	46	52	0～175	138	64
玉米片	美国	15	16	0～2790	1048	64
玉米片	加拿大	1	2	0～50	50	64
玉米片	埃及	2	2	1780～2980	2380	64
玉米片	秘鲁	1	2	0～660	660	64
玉米*	塞舍尔查尔斯顿	7	7	105～1915	635	64

续表

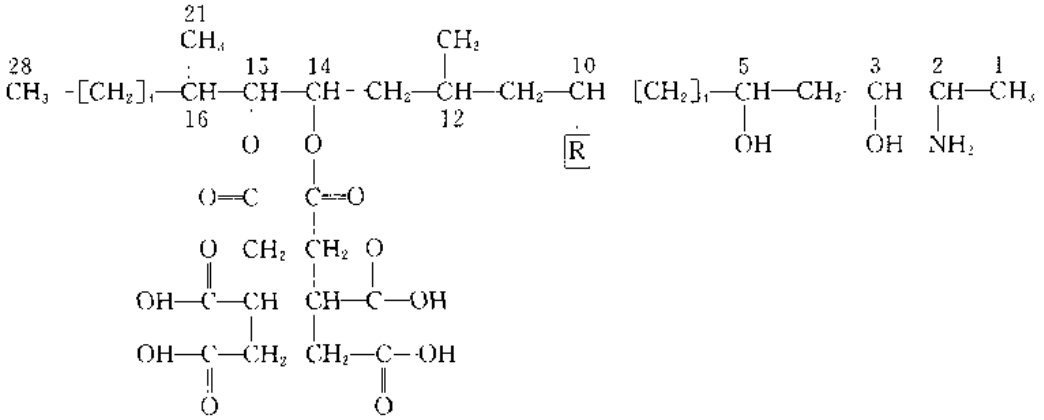
产　品	国　家	样品毒素含量	样品总数	镰孢霉素含量 /ng	平均含量 /（ng/g）	参考文献
玉米[a]	南非特兰斯凯	6	6	3220～117520	53740	64
玉米（正常）[a]	南非特兰斯凯	12	12	50～7900	1600	47
玉米（正常）[b]	南非特兰斯凯	2	12	0～550	375	47
玉米（霉变）[a]	南非特兰斯凯	12	12	3450～46900	23900	47
玉米（霉变）[b]	南非特兰斯凯	11	11	450～18900	6520	47

[a] 指来自被监测的食道癌高发地区的国家；[b] 指来自食道癌低发地区。

对来自美国 11 个州的饲料样品也进行过 FB_1 的检验[49]。在 83 份与马脑白质软化症有关的饲料中，有 75%含有＞10μg/g 的 FB_1，其含量范围在 1.0～126μg/g。在 42 份涉及到猪肺水肿的饲料样品中，有 71%含有＞10μg/g 的 FB_1，其含量范围在 1.0～330μg/g。另一方面，在所有 51 份合格的饲料样品中都含有＜9μg/g 的 FB_1，其中有 94%样品中的含量＜6μg/g[49]。在密执安州采集的 71 份零售玉米食品和其它谷物食品样品中，有 11 份含有镰孢霉素，包括 17 份玉米食品中的 10 份[43]。采用 ELISA 法分析，蓝玉米粉中发现的最高 FB_1 含量水平为 15.6μg/g[43]。

当怀疑含有镰孢霉的玉米与一些动物真菌毒素病流行有关时，巴西对其中的 FB_1 和 FB_2 进行了检测，结果在 21 份样品中的 20 份内发现了 FB_1（含量范围在 200～38 500ng/g），而在 21 份样品中的 18 份内发现了 FB_2（含量范围在 100～12 000ng/g）[62]。在从这些玉米中分离的镰孢霉中，除了 1 株之外，所有菌株对小鸭都有剧烈毒性。

27.8.3　FB_1 和 FB_2 的物理、化学性质



镰孢霉素 B_1[1]和 B_2[2]

[1] R=OH　　[2] R=H

这两者的差别只是 FB_1 在 C_{10} 的 H 位上具有一个—OH。这两种毒素与本章讨论的其它毒素有两个方面的不同：其一它们不具有环状基团；其二它们是水溶性的。另一方面，它们与其它真菌毒素一样也是耐热性毒素。在一次研究中，含有 FB_1 的冷冻干燥培养物

煮沸 30min 后，再在 60℃下干燥 24h，毒素活性仍然没有损失[1]。

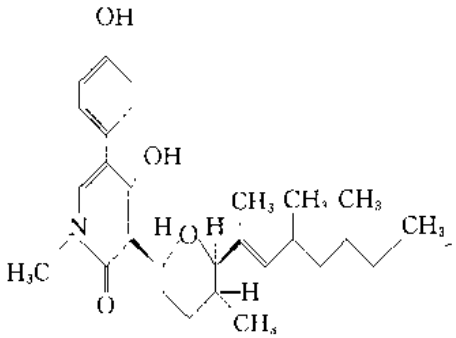
27.8.4 病理学

在实验动物中，肝脏是 FB_1 主要的靶器官。在采用老鼠长达 26 个月的研究期间，所有的鼠在 18 个月后都已死亡，或者由于小结硬化和巨结硬化，和在肝门处的胆管纤维变性产生的巨大膨胀结而致死[24]（在老鼠中胆管纤维变性被认为是胆管癌的前兆）。在 18～26 月内被致死的老鼠中，有 66%发展成了初期肝细胞癌。有些老鼠还涉及到肾脏病变，但这只是在本次实验快结束时才出现的。在这些实验动物中未发现食道损害，在 25 只对照样中也未发现赘生性变化[24]。在定量饲喂含 50 000ng/g FB_1 饲料的 26 个月实验中，已经证实了 FB_1 在老鼠中的致肝癌活性[24]。在一项早期的研究中发现，FB_1 还有助癌活性，因为它能提高老鼠体内 γ-谷氨酰转肽酶活力[1]。

据报道，在连续 7d 中以每天每克活性组织中 0.125mg 的水平静脉注射 FB_1，使马患上了脑白质软化症[65]。两匹马以口服的方式摄入了 1.25～4mg/g 体重 FB_1 后也患上了脑白质软化症，发病症状是在 25d 左右出现的[65]。一头猪在注射 0.4mg/g 体重 FB_1 4d 后患上了肺水肿症[65]。在南非特兰斯凯，人食道癌的流行显然与玉米中高水平的 FB_1 和 FB_2 有关[64]。

27.9 接骨木镰孢毒素

这种真菌毒素最早的报道是在 1994 年[30]。它的结构如下：

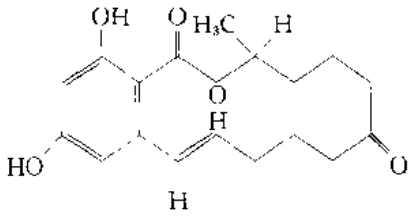


接骨木镰孢毒素与干腐的马铃薯有关，它主要是由接骨木镰孢霉（*Fusarium sambucinum*）和尖镰孢霉（*F. oxysporum*）的一些菌株产生的。在所检测的 13 种镰孢霉中，上述两种镰孢霉的 90%菌株都产生了这种毒素。从韩国 21 份腐烂的马铃薯样品中，有 9 份含有 15.8～78.1ng/g 接骨木镰孢毒素，平均含量为 49.2ng/g[31]。采用小麦培养基时，生成接骨木镰孢毒素的水平为 1.1～101μg/g。这种毒素在来源于伊朗一些地区的马铃薯中被发现，这些地区的食道癌发病率较高[30]。

接骨木镰孢毒素能导致老鼠胃和肠道出血，并能引起动物厌食和轻重减轻[30]。当老鼠的饲料中含有 0.1%接骨木镰孢毒素时，会使它们在 4d 内死亡。这种毒素对鸡胚胎致死的 LD_{50} 值为 29.6μg/只[30]。

27.10　玉米镰孢酮

自然界中出现的玉米镰孢酮至少有5种，它们是由某些镰孢霉产生的，其主要产生菌有禾草镰孢霉（*F. graminearum*）[以前称为粉红镰孢霉（*F. roseum*），玉米赤霉（*Gibberella zeae*）]和三隔镰孢霉（*F. tricinctum*）。这些霉菌常常在玉米的吐须阶段感染田野中的玉米，尤其是在雨量很大的情况下。如果在玉米收获后仍然维持潮湿状态，这些霉菌就能生长和产生毒素。除了玉米之外，其它庄稼如小麦、燕麦、大麦和芝麻也能被这些菌感染。



玉米镰孢酮

这些毒素在长波紫外线下呈现蓝绿色荧光，而在短波紫外线下呈现微绿色荧光。这些毒素具有雌激素的性质，它们能促进老鼠发情和导致猪的血雌激素过多症。虽然它们在阿麦斯试验中不呈现致突变性质，但是它们在枯草杆菌莱克试验中能呈现阳性反应[58]。

参 考 文 献

[1] Alberts, J. F., W. C. A. Gelderblom, P. G. Thiel, W. F. O. Marasas, D. J. van Schalkwyk, and Y. Behrend. 1990. Effects of temperature and incubation period on production of fumonisin B_1 by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 1729～1733.

[2] Altug, T., A. E. Yousef, and E. H. Marth. 1990. Degradation of aflatoxin B_1 in dried figs by sodium bisulfite with or without heat, ultraviolet energy or hydrogen peroxide. *J. Food Protect.* 53: 581～582.

[3] Ayres, J. C., J. O. Mundt, and W. E. Sandine. 1980. *Microbiology of Foods*, 658～683. San Francisco: Freeman.

[4] Bacon, C. W., J. G. Sweeney, J. D. Hobbins, and D. Burdick. 1973. Production of penicillic acid and ochratoxin A on poultry feed by *Aspergillus ochraceus*: Temperature and moisture requirements. *Appl. Microbiol.* 26: 155～160.

[5] Buchanan, R. L., M. A. Harry, and M. A. Gealt. 1983. Caffeine inhibition of sterigmatocystin, citrinin, and patulin production. *J. Food Sci.* 48: 1226～1228.

[6] Bullerman, L. B. 1976. Examination of Swiss cheese for incidence of mycotoxin producing molds. *J. Food Sci.* 41: 26～28.

[7] Bullerman, L. B. 1981. Effects of potassium sorbate on growth and patulin production by *Penicillium patulum* and *Penicillium roquefortii*. *J. Food Protect.* 47: 312～316.

[8] Bullerman, L. B., P. A. Hartman, and J. C. Ayres. 1969. Aflatoxin production in meats. I.

Stored meats. *Appl. Microbiol.* 18: 714～717.

[9] Bullerman, L. B., P. A. Hartman, and J. C. Ayres. 1969. Aflatoxin production in meats. Ⅱ. Aged dry salamis and aged country cured hams. *Appl. Microbiol.* 18: 718～722.

[10] Busby, W. F., Jr., and G. N. Wogan. 1979. Food-borne mycotoxins and alimentary mycotoxicoses. In *Food-borne Infections and Intoxications*, ed. H. Riemann and F. L. Bryan, 519～610. New York: Academic Press.

[11] Butler, W. H. 1974. Aflatoxin. In *Mycotoxins*, ed. I. F. H. Purchase, 1～28. New York: Elsevier.

[12] Camou-Arriola, J. P., and R. L. Price. 1989. Destruction of aflatoxin and reduction of mutagenicity of naturally-contaminated corn during production of a corn snack. *J. Food Protect.* 52: 814～817.

[13] Chelkowski, J. and A. Visconti, eds. 1992. *Alternaria: Biology, Plant Diseases and Metabolites.* New York: Elsevier.

[14] Christensen, C. M. 1971. Mycotoxins, *CRC Crit. Rev. Environ. Cont.* 2: 57～80.

[15] Chulze, S. N., A. M. Torres, A. M. Dalcero, M. G. Etcheverry, M. L. Ramirez, and M. C. Farnochi. 1995. *Alternaria* mycotoxins in sunflower seeds: Incidence and distribution of the toxins in oil and meal. *J. Food Protect.* 58: 1133～1135.

[16] Ciegler, A., H. J. Mintzlaff, D. Weisleder, and L. Leistner. 1972. Potential production and detoxification of penicillic acid in mold-fermented sausage (salami). *Appl. Microbiol.* 24: 111～119.

[17] Davis, N. D., and U. L. Diener. 1987. Mycotoxins. In *Food and Beverage Mycology*, 2nd ed., ed. L. R. Beuchat, 517～570. New York: Van Nostrand Reinhold.

[18] Davis, V. M., and M. E. Stack. 1991. Mutagenicity of stemphyltoxin Ⅲ, a metabolite of *Alternaria alternata*. *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 180～182.

[19] Deger, G. E. 1976. Aflatoxin—human colon carcinogenesis? *Ann. Intern. Med.* 85: 204～205.

[20] El-Banna, A. A., and P. M. Scott. 1984. Fate of mycotoxins during processing of foodstuffs. Ⅱ. Ochratoxin A during cooking of faba beans (*Vicia faba*) and polished wheat. *J. Food Protect.* 47: 189～192.

[21] Enomoto, M., and M. Saito. 1972. Carcinogens produced by fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* 26: 279～312.

[22] Escher, F. E., P. E. Koehler, and J. C. Ayres. 1973. Production of ochratoxins A and B on country cured ham. *Appl. Microbiol.* 26: 27～30.

[23] Farber, J. M. and G. W. Sanders. 1986. Fusarin C Production by North American isolates of *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 51: 381～384.

[24] Gelderblom, W. C. A., N. P. J. Kriek, W. F. O. Marasas, and P. G. Thiel. 1991. Toxicity and carcinogenicity of the *Fusarium moniliforme* metabolite, fumonisin B_1, in rats. *Carcinogenesis* 12: 1247～1251.

[25] Gelderblom, W. C. A., K. Jaskiewicz, W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, R. M. Horak, R. Vleggaar, and N. P. J. Kriek. 1988. Fumonisins- novel mycotoxins with cancer-promoting activity produced by *Fusarium moniliforme*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54: 1806～1811.

[26] Harrison, M. A. 1989. Presence and stability of patulin in apple products: A review. *J. Food Saf.* 9: 147～153.

[27] Hesseltine, C. W. 1967. Aflatoxins and other mycotoxins. *Hlth Lab. Sci.* 4: 222～228.

[28] Holmquist, G. U., H. W. Walker, and H. M. Stahr. 1983. Influence of temperature, pH, water activity and antifungal agents on growth of *Aspergillus flavus* and *A. parasiticus*. *J. Food Sci.* 48: 778~782.

[29] Jorgenssen, K. V., D. L. Park, S. M. Rua, Jr., and R. L. Price. 1990. Reduction of mutagenic potentials in milk: Effects of ammonia treatment on aflatoxin contaminated cottonseed. *J. Food Protect.* 53: 777~778 and 817.

[30] Kim, J-C and Y-W Lee. 1994. Sambutoxin, a new mycotoxin produced by toxic *Fusarium* isolates obtained from rotted potato tubers. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 4380~4386.

[31] Kim, J-C, Y-W Lee, and S-H Yu. 1995. Sambutoxin-producing isolates of *Fusarium* species and occurrence of sambutoxin in rotten potato tubers. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3750~3751.

[32] Kurtzman, C. P., B. W. Horn, and C. W. Hesseltine. 1987. *Aspergillus nominus*, a new aflatoxin-producing species related to *Aspergillus flavus* and *Aspergillus tamarii*. *Antonievan Leeuwenhoek* 53: 147~158.

[33] Labuza, T. P. 1983. Regulation of mycotoxins in food. *J. Food Protect.* 46: 260~265.

[34] Leistner, L. and C. Eckardt. 1979. Vorkommen toxigener Penicillien bei Fleischerzeugnissen. *Fleischwirtsch.* 59: 1892~1896.

[35] Leistner, L., and F. Tauchmann. 1979. Aflatoxinbildung in Rohwurst durch verschiedene *Aspergillus flavus*-Stamme und einer *Aspergillus parasiticus*-Stamm. *Fleischwirtschaft* 59: 965~966.

[36] Lie, J. L., and E. H. Marth. 1967. Formation of aflatoxin in Cheddar cheese by *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Dairy Sci.* 50: 1708~1710.

[37] Marasas, W. F. O., K. Jaskiewicz, F. S. Venter, D. J. van Schalkwyk. 1988. *Fusarium moniliforme* contamination of maize in oesophageal cancer areas in Transkei. *S. Afr. Med. J.* 74: 110~114.

[38] Marin, S., V. Sanchis, I. Vines, R. Canela, and N. Magan. 1995. Effect of water activity and temperature on growth and fumonisin B_1 and B_2 production by *Fusarium proliferatum* and *F. moniliforme* on maize grain. *Lett. Appl. Microbiol.* 21: 298~301.

[39] Marth, E. H., and B. G. Calanog. 1976. Toxigenic fungi. In *Food microbiology: Public Health and Spoilage Aspects*, ed. M. P. deFigueiredo and D. F. Splittstoesser, 219~256. Westport, Conn.: AVI.

[40] Niranjan, B. G., N. K. Bhat, and N. G. Avadhani. 1982. Preferential attack of mitochondrial DNA by aflatoxin B_1 during hepatocarcinogenesis. *Science* 215: 73~75.

[41] Northolt, M. D., C. A. H. Verhulsdonk, P. S. S. Soentoro, and W. E. Paulsch. 1976. Effect of water activity and temperature on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus*. *J. Milk Food Technol.* 39: 170~174.

[42] Pestka, J. J., M. N. Abouzied, and Sutikno (sic). 1995. Immunological assays for mycotoxin detection. *Food Technol.* 49 (2): 120~128.

[43] Pestka, J. J., J. I. Azcona-Olivera, R. D. Plattner, F. Minervini, M. B. Doko, and A. Visconti. 1994. Comparative assessment of fumonisin in grain-based foods by ELISA, GC-MS, and HPLC. *J. Food Protect.* 57: 169~172.

[44] Pittet, A., V. Parisod, and M. Schellenberg. 1992. Occurrence of fumonisins B_1 and B_2 in corn based products from the Swiss market. *J. Agric. Food Chem.* 40: 1352~1354.

[45] Park, K. Y., and L. B. Bullerman. 1983. Effect of cycling temperatures on aflatoxin production by *Aspergillus parasiticus* and *Aspergillus flavus* in rice and cheddar cheese. *J. Food Sci.* 48: 889～896.

[46] Ram, B. P., P. Hart, R. J. Cole, and J. J. Pestka. 1986. Application of ELISA to retail survey of aflatoxin B_1 in peanut butter. *J. Food. Protect.* 49: 792～795.

[47] Rheeder, J. P., W. F. O. Marasas, P. G. Thiel, E. W. Sydenham, and D. J. van Schalkwyk. 1992. *Fusarium moniliforme* and fumonisins in corn in relation to human esophageal cancer in Transkei. *Phytophathol.* 82: 353～357.

[48] Roland, J. O., and L. R. Beuchat. 1984. Biomass and patulin production by *Byssochlamys nivea* in apple juice as affected by sorbate, benzoate, SO_2 and temperature. *J. Food Sci.* 49: 402～406.

[49] Ross, P. F., L. G. Rice, R. D. Plattner, G. D. Osweiler, T. M. Wilson, D. L. Owens, H. A. Nelson, and J. L. Richard. 1991. Concentrations of fumonisin B_1 in feeds associated with animal health problems. *Mycopathol.* 114: 129～135.

[50] Ross, P. F., P. E. Nelson, J. L. Richard, G. D. Osweiler, L. G. Rice, R. D. Plattner, and T. M. Wilson. 1990. Production of fumonisins by *Fusarium moniliforme* and *Fusarium proliferatum* isolates associated with equine leukoencephalomalacia and a pulmonary edema syndrome in swine. *Appl. Environ. Microbiol.* 56: 3225～3226.

[51] Schindler, A. F. 1977. Temperature limits for production of aflatoxin by twenty-five isolates of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *J. Food. Protec.* 40: 39～40.

[52] Serck-Hanssen, A. 1970. Aflatoxin-induced fatal hepatitis? *Arch. Environ. Hlth.* 20: 729～731.

[53] Shelef, L. A., and B. Chin. 1980. Effect of phenolic antioxidants on the mutagenicity of aflatoxin B_1. *Appl. Environ. Microbiol.* 40: 1039～1043.

[54] Shih, C. N. and E. H. Marth. 1974. Some cultural conditions that control biosynthesis of lipid and aflatoxin by *Aspergillus parasiticus*. *Appl. Microbiol.* 27: 452～456.

[55] Shotwell, O. L., and C. W. Hesseltine. 1983. Five-year study of mycotoxins in Virginia wheat and dent corn. *J. Assoc. Off. Anal. Chem.* 66: 1466～1469.

[56] Sommer, N. F., J. R. Buchanan, and R. J. Fortlage. 1974. Production of patulin by *Penicillium expansum*. *Appl. Microbiol.* 28: 589～593.

[57] Stahr, H. M., R. L. Pfeiffer, P. J. Imerman, B. Bork, and C. Hurburgh. 1990. Aflatoxins—the 1988 outbreak. *Dairy Food Environ. Sanit.* 10: 15～17.

[58] Stark, A. -A. 1980. Mutagenicity and carcinogenicity of mycotoxins: DNA binding as a possible mode of action. *Ann. Rev. Microbiol.* 34: 235～262.

[59] Stinson, E. E., D. D. Bills, S. F. Osman, J. Siciliano, M. J. Ceponis, and E. G. Heisler. 1980. Mycotoxin production by *Alternaria* species grown on apples, tomatoes, and blueberries. *J. Agric. Food Chem.* 28: 960～963.

[60] Stinson, E. E., S. F. Osman, E. G. Beisler, J. Siciliano, and D. D. Bills. 1981. Mycotoxin production in whole tomatoes, apples, oranges, and lemons. *J. Agric. Food Chem.* 29: 790～792.

[61] Stoloff, L. 1987. Carcinogenicity of aflatoxins. *Science* 237: 1283～1284 (letter to editor with two responses).

[62] Sydenham, E. W., W. F. O. Marasas, G. S. Shephard, P. G. Thiel, and E. Y. Hirooka. 1992. Fumonisin concentrations in Brazalian feeds associated with field outbreaks of confirmed and

suspected animal mycotoxicoses. *J. Agric. Food Chem.* 40: 994～997.

[63] Sydenham, E. W., G. S. Shephard, P. G. Thiel, W. F. O. Marasas, and S. Stockenström. 1991. Fumonisin contamination of commercial corn-based human foodstuffs. *J. Agric. Food Chem.* 39: 2014～2018.

[64] Sydenham, E. W., P. G. Thiel, W. F. O. Marasas, G. S. Shephard, D. J. van Schalkwyk, and K. R. Koch. 1990. Natural occurrence of some *Fusarium* mycotoxins in corn from low and high esophageal cancer prevalence areas of the Transkei, southern Africa. *J. Agric. Food Chem.* 38: 1900～1903.

[65] Thiel, P. G., W. F. O. Marasas, E. W. Sydenham, G. S. Shephard, and W. C. A. Gelderblom. 1992. The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopatholog.* 117: 3～9.

[66] Tong, C. -H., and F. A. Draughon. 1985. Inhibition by antimicrobial food additives of ochratoxin A production by *Aspergillus sulphureus* and *Penicillium viridicatum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 1407～1411.

[67] Trenk, H. L., and P. A. Hartman. 1970. Effects of moisture content and temperature on aflatoxin production in corn. *Appl. Microbiol.* 19: 781～784.

[68] Wheeler, K. A., B. F. Hurdman, and J. I. Pitt. 1991. Influence of pH on the growth of some toxigenic species of *Aspergillus*, *Penicillium* and *Fusarium*. *Int. J. Food Microbiol.* 12: 141～150.

[69] Wiebe, L. A. and L. F. Bjeldanes. 1981. Fusarin C, a mutagen from *Fusarium moniliforme* grown on corn. *J. Food Sci.* 46: 1424～1426.

[70] Wheeler, J. L., M. A. Harrison, and P. E. Koehler. 1987. Presence and stability of patulin in pasteurized apple cider. *J. Food Sci.* 52: 479～480.

[71] Wogan, G. N. 1966. Chemical nature and biological effects of the aflatoxins. *Bacteriol. Rev.* 30: 460～470.

[72] Wu, M. T., J. C. Ayres, and P. E. Koehler. 1974. Production of citrinin by *Penicillium viridicatum* on country-cured ham. *Appl. Microbiol.* 27: 427—428.

[73] Yoshizawa, T., A. Yamashita, and Y. Luo. 1994. Fumonisin occurrence in corn from high-and low-risk areas for human esophageal cancer in China. *Appl. Environ. Microbiol.* 60: 1626～1929.

28. 病毒和其它食品中的生物危害

本部分讨论的内容包括食品中的病毒、鲭鱼毒素和贝类麻痹毒素所导致的危害。另外还将讨论嗜水气单孢菌（*Aeromnas hydrophila*）、类志贺邻单孢菌（*Plesiomonas shigelloides*）和脆弱拟杆菌（*Bacteroides fragilis*）等可能成为食物中毒病原菌的一些背景资料。

28.1 病毒

与细菌和真菌相比，人们对食品中病毒的出现情况了解很少，这有多方面的原因。首先，作为完全寄生性的微生物，病毒并不像细菌和真菌那样能在培养基上生长。培养病毒的常用方法是组织培养和鸡胚胎培养。第二，因为病毒不能在食品中繁殖，它们的可检出数量要比细菌少得多，所以提取病毒必须采用一些分离和浓缩方法。虽然在病毒的分离方法上人们进行过大量研究，但是目前还难以有效地从食品（例如绞碎牛肉）中提取50%以上的病毒颗粒。第三，科研实验室中的病毒学技术还难以应用到食品微生物检测实验室中。第四，并不是所有的食品微生物学家关心的病毒都能用现有的技术进行培养，例如诺沃克病毒就是其中之一。但是，最近开发的一种反向转录多聚酶链反应检测方法（RT-PCR）能直接检测一些食品（例如牡蛎和蛤类组织）中存在的病毒[4]。因为已经证实任何肠道细菌病原菌都是在卫生条件不良的情况下进入食品的，所以也可以推测肠道病毒的感染途径也是如此，即使它们在食品中不能繁殖。Cliver 等人[16]注意到任何食品可以作为病毒传播的载体，这就强调了粪便-口入传播模式的重要性，尤其是对于食品来源的病毒性肝炎的传播。如同人类非肠道细菌也可能有时出现在食品中一样，非肠道病毒也可能出现在食品中，但是由于病毒具有组织亲和性，所以食品只能作为肠道病毒或肠病毒传播的载体。这些病毒可以在某些贝类中积累到900倍的水平[23]。病毒性胃肠炎被认为是仅次于普通感冒的发生频率最高的疾病。

可能发现于食品中的一组病毒概括在表28.1中。除了A型肝炎病毒和轮状病毒之外，人们关心的主要是直径为28～35nm的病毒，包括诺沃克病毒、环状病毒和星形病毒，它们将在“诺沃克病毒”和其它专题中分别讨论。

在食品与环境中的发生率：胃肠炎病原病毒最常见的食品来源是贝类。虽然甲壳类动物不能浓缩病毒，但作为软体动物的贝类却可能，因为它们对食物有筛滤作用。当1型脊髓灰质炎病毒存在于水中时，蓝蟹会被感染，但是它们并不能浓缩这种病毒[28]。人为地用10^4pfu（溶菌圈形成单位）水平的脊髓灰质炎病毒感染带壳的牡蛎，再保存在冷藏箱中30～90d后，病毒的存活率为10%～13%[19]。据报道，当水中的肠病毒浓度低于0.01pfu/mL时，牡蛎和蛤类不太可能吸收这些病毒[44]。后一组研究者采用的分离方法可以检测出每只贝中1.5～2.0pfu的病毒。

虽然大肠菌群指数可以作为肠道病原菌对水源污染的一个指标，但是对于衡量肠病

表 28.1　可能导致食品污染的人肠道病毒

小核糖核酸病毒
脊髓灰质炎病毒 1-3 型
柯萨奇病毒 A1-24 型
柯萨奇病毒 B1-6 型
ECHO 病毒 1-34 型
肠病毒 68-71 型
可能 A 型肝炎病毒
呼肠孤病毒
呼肠孤病毒 1-3 型
轮状病毒
细小病毒
人胃肠道病毒
乳头多瘤空泡病毒
人 BK 和 JC 病毒
腺病毒
人腺病毒 1-33 型

注：摘自 Larkin[41]，copyright Dc 1981 by international Association of Milk，Food and Environmental Sanitarians.

毒来说是不充分的，因为与病原菌相比肠病毒对恶劣环境的耐受性更强[56]。在对来自美国得克萨斯州海湾上部静水中的 150 份样品的研究中，发现所有样品都含有肠病毒，但是只有 43%样品的大肠菌群指数合格，而有 44%样品的粪大肠菌群指标合格[24]。在同一次研究中，发现含肠病毒的水样中有 35%符合贝类收获卫生标准，所以这些研究者认为，大肠菌群指标不能反映水源中病毒的存在状况。在研究北卡罗来纳州沿海的硬壳蛤类时发现，来自开放海域和封闭海域（因为大肠菌群超标而禁止进行商业性贝类养殖的海域）的蛤类都含有肠病毒[67]。在来自开放水域的 13 份样品（每份 100g）中有 3 份呈病毒阳性，而所有的 13 份样品都呈沙门氏菌、志贺氏菌和耶尔森氏菌阴性。在来自封闭水域的 15 份样品中有 6 份呈沙门氏菌阳性，而所有的样品都是志贺氏菌和耶尔森氏菌阴性[67]。后一组研究者认为，在养殖贝类的水域中，肠病毒的出现与总大肠菌数或粪大肠菌数没有对应关系，或在养殖蛤类的水域中，肠病毒的出现与总大肠菌数、粪大肠菌数、粪链球菌数或好氧平板计数菌数（APC）之间也没有对应关系。虽然在来自开放水域的贝类中可以检出肠病毒，但是美国食品与药物管理局检测的贝类样品中只有不到 1%的样品含有病毒[44]。关于安全指标和病毒方面更详细的讨论请参阅第六部分 18。

关于某些病毒在食品中的存活能力，据发现肠病毒在绞碎的牛肉中于 23℃或 24℃下存活了 8d，而且病毒的存活能力不受污染细菌生长的影响[29]。在研究 14 种蔬菜样品中病毒的自然出现状况时，都没有发现病毒存在，而将柯萨奇病毒 B5 接种到蔬菜上在 4℃下贮存 5d 之后也未见有病毒存活[39]。在一项早期的研究中发现，当柯萨奇病毒 B5 添加到莴苣上贮存在 40℃的潮湿环境中时，16d 后未见其活性有任何下降。有数种肠病毒未能在水果表面存活，在所检验的 9 份水果样品中也未发现自然出现的病毒[40]。Fugate 等人[32]在 17 份生牡蛎样品中发现了 1 份样品中含有 4 型 ECHO 病毒，另 1 份样品中含有 1 型脊髓灰质炎病毒，而在另外 24 份牡蛎样品中有 1 份含有 3 型脊髓灰质炎病毒。在对 7 家食品加工厂中人类病毒的监测中，在 1 家蔬菜加工厂和 3 家肉类加工厂中均未发现病毒[41]。后一组调查者检验了来源于市场上的 60 份食品样品，但是在任何样品中未能检出病毒。他们得出结论，病毒在美国食品中的存在是很少的。

在食品中被杀灭：McKercher 等人[46]研究了猪霍乱病毒和非洲猪热病毒在肉类加工

制品中的存活情况。他们用这两种病毒感染的猪肉制作了中等强度加热的腌肉罐头、加胡椒香肠和萨拉米香肠，虽然从上述罐装腌肉中未检出病毒，但是在猪肉被腌制之后检出了病毒，而在加热之后则检测不出病毒。在两种香肠原料肉中添加腌制调料和发酵菌种之后，非洲猪热病毒能够存活，但是在发酵 30d 之后进行检测则出现了阴性结果。猪霍乱病毒在添加腌制调料和发酵菌种之后也能存活，并且在发酵 22d 后仍能保持其活性。

Blackwell 等人[5]研究了加热对口蹄疫病毒的致死情况。当病毒感染的淋巴结组织混入绞碎牛肉中加热至内部温度达到 93.3℃时，病毒即被杀死。在牛淋巴结组织中，病毒在 90℃加热 15min 后仍能存活，但是加热 30min 后不能存活。据发现，螃蟹煮熟后足以能杀死 99.9%的 1 型脊髓灰质炎病毒，轮状病毒和 ECHO 病毒也能在 8min 内被杀死[26]。在炖煮、油炸、烘烤或蒸煮的牡蛎中发现有一种脊髓灰质炎病毒[19]。烤制汉堡包，在 24 份烤制得较轻（内部温度达到 60℃），并且在烤制后立即冷却到 23℃的馅饼样品中，有 8 份被分离出了肠道病毒[61]。如果馅饼在 3min 内冷却至室温再检测，则未检出病毒。

28.1.1 A 型肝炎病毒

有记载的起因于食品的 A 型肝炎感染事件比任何其它病毒感染事件都多。这种病毒属于小核糖核酸病毒科，脊髓灰质炎病毒、ECHO 病毒和科萨奇病毒也属于这一科，它们都具有单链 RNA 基因体。感染肝炎病毒后的潜伏期为 15～45d，再感染之后一般能获得终生免疫力。粪便-口入途径是肝炎病毒的传播方式，生的或未煮透的来源于污染水域的贝类是最常见的载毒食品。

美国在 1973、1974 和 1975 年，分别发生了 5、6 和 3 起病毒感染事件，其中涉及感染人数分别为 425、282 和 173 人。有 1975 起感染事件被追溯到了餐馆中供应的色拉、三明治和挂糖衣面包圈。美国 1983～1987 年间记载的感染事件和病例概括在表 28.2 中。根据美国疾病控制中心统计，美国在 1983～1989 年间 A 型肝炎的发病人数增加了 58%，从每 100 000 人中的 9.2 人增加到了 14.5 人[12]。在 1988 年感染的患者中，有 7.3%是起因于食品或水源[12]。某些食品起因的病毒感染实例概括在表 28.3 中。

表 28.2 美国 1983～1987 年间病毒性食物中毒胃肠炎的流行事件数、患病人数和死亡人数

年份	A 型肝炎			诺沃克病毒			其它病毒		
	流行事件数	患病人数	死亡人数	流行事件数	患病人数	死亡人数	流行事件数	患病人数	死亡人数
1983	10	330	1	1	20	0	—	—	—
1984	2	20	0	1	137	0	1	143	0
1985	5	118	0	4	179	0	1	444	0
1986	3	263	0	3	463	0			
1987	9	187	0	1	365	0			
总计	29	1967	1	10	1164	0	2	558	0

注：资料来源 N. H. Bean, P. M. Griffin, J. S. Goulding, and C. B. Ivey. 1990. J Food Protect. 53: 711～728

表 28.3　　某些食品起因的病毒感染实例

病　毒	载毒食品/来源/评论
A 型肝炎	1975 年在美国纽约州、俄克拉何马州和俄勒冈州总共发生了 3 起来源于挂糖衣面包圈、三明治和色拉/三明治的中毒事件，发病 173 人
A 型肝炎	在美国宾夕法尼亚州约 580 人食用了三明治，其中有 18 人中毒发病
A 型肝炎	发现病毒存在于牡蛎中
A 型肝炎	在美国纽约州发生了 3 起中毒事件，涉及含毒贝类食品的约 238 人中有 10 人中毒患病，载毒食品是生的贝类
A 型肝炎	在美国新泽西州一家雇用了一名病毒携带 A 型肝炎病毒阳性厨师的餐馆中有 56 人中毒患病
A 型肝炎	1983 年在俄克拉何马州的一家免下车餐馆中，约有 203 人染病
A 型肝炎	1983 年在美国得克萨斯州一家色拉吧餐馆中，有 123 人被感染，有一名厨师被怀疑带有病毒
诺沃克病毒	1978 年在澳大利亚约有 2000 人食用了牡蛎而被感染
诺沃克病毒	1979 年在美国新泽西州食用色拉的 190 人中约有 71% 被感染，发现绿色色拉(莴苣)含有病毒，可能是来自海产品的交叉污染
诺沃克病毒	1980 年在美国佛罗里达州发生的一起事件中涉及到生牡蛎。涉及含毒食品的 13 人中有 6 人感染患病。病毒是由 RIA 进行鉴定的
诺沃克病毒	1976　1980 年间在英国发生了 6 起病毒中毒事件，感染的潜伏期为 24～48h，涉及食用了包括海产品在内的一系列含毒食品后的 2590 人中约有 45% 感染患病
诺沃克病毒	1982 年在美国明尼苏达州，383 人在食用了一名患病厨师和另一名患胃肠炎才痊愈的厨师制作的凉拌卷心菜、马铃薯、水果和调配色拉后有 57% 的人感染患病
诺沃克病毒	1982 年在美国明尼苏达州，一名患胃肠炎的食品加工者感染了 3000 人，他制作的食品包括撒了糖粉的糕饼
诺沃克病毒	1982 年 5 月至 12 月，美国纽约州记载了 103 起胃肠炎流行事件，涉及感染人数 1017 人。载毒食品是生的蛤类和贝类。在 7 起事件中鉴定出了有 71% 的病例是诺沃克病毒所为
诺沃克病毒	1987 年在美国费城有 200 多名大学生和足球队员表现出了典型的诺沃克病毒胃肠炎症状，感染是由于在软饮料中加入了冰块之故。这起事件中鉴定出了一种 27nm 的病毒
SRSV 诺沃克病毒	1991 年 10 月在加拿大魁北克省，有 200 多人感染患病。来自可接受水域的生牡蛎是载毒食品
SRSV 诺沃克病毒	1993 年 11 月，至少有 180 人被来自美国路易斯安那州海岸海床中的牡蛎所感染，感染的病例遍及路易斯安那、马里兰、密西西北和北卡罗来纳州。平均感染潜伏时间 34h，平均症状延续时间 37h
SRSV 诺沃克病毒	1993 年 11 月在美国佛罗里达州有 45 人食用了来自符合贝类卫生标准的水域中的生牡蛎而感染患病
诺沃克病毒-及类似病毒	1994 年 12 月 29～31 日有 34 人分别食用了来自美国佛罗里达州阿巴拉奇克拉地区两个海湾的牡蛎之后感染患病。1995 年 1 月 1 日检测该地区的粪大肠菌群指标在允许的范围内

28.1.2　诺沃克病毒和有关的病毒

这些病毒被称为小圆结构化病毒（SRSVs），也称为诺沃克病毒。它们属于一个很大的异源科——杯状病毒科（*Caliciviridae*）。诺沃克病毒最先是 1968 年在美国俄亥俄州诺

沃克市的一家学校的食物中毒事件中被分离出来的而被命名的，当时的水源被怀疑含有病毒，但未能被证实。它是小圆结构化病毒的原型。

诺沃克病毒及与其密切相关的病毒大小为 28～38nm，可以分成 3 个组：

①小圆结构化病毒：具有不规则的表面。除了诺沃克病毒之外，还包括夏威夷病毒、雪山病毒、托恩顿病毒和其它病毒。现在已知在小圆结构化病毒中有 3 个基因组。第一组是诺沃克病毒、第二组是雪山病毒和夏威夷病毒，第三组包括北海道菌株。

②环状病毒：表面具有凹坑。它们类似于小核糖核酸病毒，能在 1～3d 内导致儿童呕吐和腹泻。抗体不能与诺沃克病毒发生交叉反应。

③星形病毒：表面具有 5 颗或 6 颗星形斑点。它们是已知偶尔能导致儿童和成人胃肠炎的病毒，而 7 岁以下的儿童对它是最敏感的。发病症状会在 24～36h 内出现，包括呕吐、腹泻和发热。

环状病毒和星形病毒的一些毒株已经可以在体外培养。本节下面只讨论诺沃克病毒。

诺沃克病毒主要感染大龄儿童和成人，美国成人中约有 67%人体内具有血清抗体[18]。在 1976—1980 年间报告至美国疾病控制中心的 74 起非细菌性急性食物中毒事件中，有 42%与诺沃克病毒有关，这是根据抗体滴度上升了 4 倍来判定的[34]。这种病毒是已知与旅行腹泻症有关的病毒，显然污染水是病毒的来源之一。

在 1983—1987 年间，美国有记载的与食品有关的中毒事件概括在表 28.2 中，某些食品起因的病毒感染实例概括在表 28.3 中。1979 年美国发生的 430 例病例中，有 4%表现出了诺沃克病毒胃肠炎症状[35]。据认为与任何其它单独一种细菌相比，这种病毒在 1985 年明尼苏达州发生的食物中毒胃肠炎事件中都更为重要[42]。

最早报道的与小圆结构化病毒有关的食物中毒事件 1976 年发生在英国。从 1976 年 12 月 21 日至 1977 年 1 月 10 日，英国发生了 33 起中毒事件，涉及患病人数 797 人，海扇被认为是载毒食品[32]。这种病毒的潜伏期为 24～30h，在分析的 14 份粪便样品中有 12 份被证实含有直径为 25～26nm 的小圆结构化病毒颗粒，但是未能在海扇中发现它们。虽然这些研究者认为所发现的病毒既不是诺沃克病毒，也不是夏威夷冰霜，但这些中毒事件仍然被某些人认为是诺沃克病毒感染。1978 年发生在澳大利亚涉及至少 2000 人，患病的时间有详细的记载，载毒食品是牡蛎[40]。这些病毒被发现存在于 39%的用电子显微镜检验的样品中，相应的抗体被证实在 75%配对血清试验中存在。这种病毒的潜伏时间为 18～48h，多数患者在 34～38h 内发病。恶心是最初的症状，一般还伴随有呕吐、无血腹泻和腹绞痛，症状一般延续 2～3d。在表 28.3 中提到的费城感染事件中，99%的患者具有恶心的症状[11]。另一起发生在澳大利亚的感染事件被追溯到了瓶装牡蛎罐头，发病症状在 24～48h 内出现[26]。这种牡蛎罐头的好氧平板计数值为 2.2×10^4/g，粪大肠菌群数为 500/100g。第一起在美国有记载的事件于 1979 年发生在新泽西州，莴苣是载毒食品，而 1980 年发生在佛罗里达州的事件是由生牡蛎引起的（见表 28.3）。后来，这种病毒可以用放射免疫分析法进行检测。

与其它肠病毒相比，诺沃克病毒对 Cl_2 的致死作用的抗性较强。在志愿者体内，饮用水中的 3.75mg/kg Cl_2 未能致死这种病毒，而 1 型脊髓灰质炎病毒、人轮状病毒和猿轮状病毒均被致死[36]。某些诺沃克病毒在残留氯水平为 5～6mg/kg 时仍然具有感染性。A 型

肝炎病毒虽然没有诺沃克病毒对 Cl_2 的抗性强，但是两者对 Cl_2 的抗性都比轮状病毒强。

28.1.3 轮状病毒

轮状病毒最早是 1973 年在澳大利亚被发现的，最早在实验室中培养是在 1981 年。轮状病毒被分为 6 个组，其中 3 个组已知对人类有感染能力。A 组是在世界范围内最常见感染婴儿和幼龄儿童的病毒。B 组能导致成人腹泻，它们只是在中国被发现。轮状病毒属于呼肠孤病毒科（*Reoviridae*），它们的直径约为 70nm，无壳，含有 dsRNA。粪便 口入模式是它们主要的传播方式。

据估计，医院中 5 岁以下儿童腹泻有三分之一是轮状病毒引起的，这种感染的高峰季节出现在冬季月份。最为敏感的是 6 个月至 2 岁的儿童，实际上美国 4 岁的儿童都曾经被感染过[1,7]。虽然多数人到 4 岁时已有免疫能力，但在较大的儿童和成人中如果感染量很大或免疫能力降低时也有可能出现较温和的症状[4,7]。已知这些病毒可以在托儿所中传播和通过饮水传染。1981 年在美国科罗拉多州发生了一起团体饮水感染事件，在 128 人中有 44%患病，其中多数为成人[30]。这次感染被认为只是偶然原因导致的食物中毒胃肠炎[17]。

轮状病毒胃肠炎的潜伏时间为 2d。第 3d 出现呕吐，第 3～8d 伴有水泻，并常伴有腹绞痛与发烧[31]。已知这种病毒与旅行腹泻症有关。

在 1989 年 1 月至 1990 年的 23 个月时间内，美国对 48 035 份粪便样品进行了检测，其中有 9639 份（20%）呈轮状病毒阳性[9]。粪便阳性比例出现最高的月份是 2 月（36%），最低是 10 月（6%）。在 1979—1985 年间，美国每年因腹泻症死亡的儿童平均为 500 人，其中 20%是由于轮状病毒感染引起的[20]。轮状病毒的寄主细胞受体蛋白也能作为 β-肾上腺素的受体。一旦进入细胞之后，轮状病毒能转移到溶酶体中，在溶酶体中脱去外壳。

轮状病毒感染可以用免疫电子显微镜、反向转录多聚酶链反应、酶联免疫吸附法和乳汁凝集法进行分析诊断。

28.2 与组胺（鲭鱼）有关的中毒

食用含有高水平组胺的鲭鱼和鱼制品的中毒常常称为鲭鱼中毒。鲭类包括金枪鱼、鲭鱼、鲣鱼和其它鱼。有一份近期的报道称，组胺中毒还与旗鱼有关，而旗鱼不属于鲭类[32]。这些鱼体的肌肉中含有总量较大的组氨酸，在细菌作用下会脱羧而形成组胺。大量组胺的生成并不一定伴随有感官上不能接受的物质生成，结果是鲭鱼中毒在食用新鲜鱼和已出现气味腐败的鱼时都有可能发生。Hudson 和 Brown[33]回顾了这种病症的发生历史，他们对组胺的致病作用提出了质疑。这个问题将在后面进一步讨论。

与这种病症最密切相关的细菌包括摩根菌属（*Morganella*）的一些菌种，尤其是摩氏摩根菌（*M. morganii*）。这些菌种都能产生组胺，其生成水平可达 400mg/100g。已知能产生组胺酸脱羧酶的细菌有：肺炎克雷伯菌（*K. Pneumoniae*）、蜂房哈夫尼菌（*Hafnia alvei*）、弗氏柠檬酸杆菌（*Citrobacter freundii*）、产气荚膜梭菌（*Clostridium perfringens*）、产气肠杆菌（*Enterobacter aerogenes*）、溶藻弧菌（*Vibrio alginolyticus*）和

一些变形菌（*Proteus*）。从在室温下已经腐败的金枪鱼中分离的470份细菌分离物中，有31%培养在肉汤中时可以产生100～400mg/100g的组胺[53]。生成组胺能力很强的有摩氏摩根菌、几种变形菌和1种克雷伯菌，而生成组胺能力较弱的包括蜂房哈夫尼菌和几种变形菌。在38℃海水中腐烂的金枪鱼中含有产气荚膜梭菌、溶藻弧菌和其它组胺酸脱羧酶产生菌[59]。一株从凤尾鱼中分离的摩氏摩根菌在培养基中于37℃下24h内产生了(2377±350) mg/kg组胺[57]。这种微生物还能产生可检测水平的腐胺和尸胺。在一次与金枪鱼生鱼片有关的鲭鱼中毒事件中，人们分离出了肺炎克雷伯菌，这种菌培养在金枪鱼浸汁中可以产生442mg/100g组胺[62]。这种中毒事件也与非鲭鱼类食品有关，尤其是与干酪有关，包括瑞士干酪，这种干酪曾经含有187mg/100g组胺；与这种中毒有关的病症可以在摄入含毒食品后的30min至1h内出现[63]。

从1972～1986年期间，报至美国疾病控制中心的组胺中毒事件有178起，涉及患病1096人，但未出现死亡[1,3]。发生在夏威夷、加利福尼亚和纽约的最大中毒事件分别涉及患病人数为51、29和24人。三种最常见的载毒食品是马黑鱼（66起）、金枪鱼（42起）和鲑鱼（19起）。虽然新鲜鱼正常含有1mg/100g组胺，但是有些鱼可能含有高达20mg/100g的组胺，这样高的水平已经可以导致某些个体出现中毒症状。美国食品与药物管理局规定的金枪鱼中组胺的危险水平为50mg/100g[13]。含毒鱼类在烹调后并不能导致食品安全。

如果已经知道培养时间和温度，就可以估计储存的金枪鱼中组胺的含量。Frank等人[21]发现在下述条件下生成了100mg/100g组胺：21.1℃ 46h、32.2℃ 23h和37.8℃ 17h。他们绘制了一份涉及温度范围在21.1～37.8℃的图表，指出了低温对于防止和延缓组胺生成的重要性。对于控制组胺生成方面，真空包装不如低温效果好[68]。Niven等人[71]研究了用于检测组胺产生菌的选择性培养基。

pH较低时有利于组胺的生成，但是产品要储存在冷藏温度以上时降低pH的作用才能更为显著。据发现，产生可检测量水平的组胺需要的最低温度如下：蜂房哈夫尼菌、弗氏柠檬酸杆菌和大肠杆菌为30℃；2株摩氏摩根菌为15℃；肺炎克雷伯菌为7℃[71]。中毒的症状是由食用了上述鲜鱼或加工后的鱼引起的，症状会在摄入含毒食品后数分钟至3h内出现，多数情况下是在1h内出现。典型的症状包括面部和颈部发红，伴有强烈的燥热感和全身不适，以及腹泻。然后常见有面部和颈部皮疹。面部红赤之后可能有剧烈的脉动性头痛，然后转为连续性晕痛。其它可能的症状还有眩晕、口干、视觉模糊、口腔和咽喉灼烧和吞咽困难[31]。据认为，能导致症状出现的组胺最低水平为100mg/100g。上述鱼类中大量的摩氏摩根菌会引发这些症状，当其中的组胺水平高于10mg/100g时就被认为对产品质量有明显影响了。

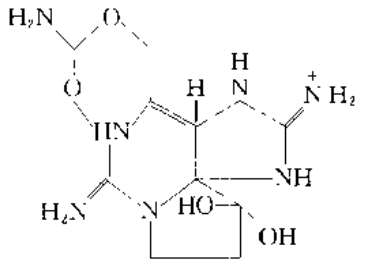
英国在1976－1979年间发生的50起事件中，除了19起事件以外都发生在1979年。罐头和烟熏的鲭鱼是最常见的载毒食品，其中鳕鱼、鲱鱼和沙丁鱼各引发了1起中毒事件。在196起中毒事件中最常见的病症是腹泻[25]。

关于在组胺中毒的病因方面，Hudson和Brown[31]认为上述证据还不足以说明组胺在本质上是导致上述症状的原因。他们提出的假想是这些病症涉及到的组胺与其它仍然未知的一些物质（例如其它胺类或影响组胺吸收的因子）存在协同作用。他们这种观点

的根据是，当志愿者服用大量组胺或含有组胺的鱼类之后，并未出现症状。另一方面，这种病症发生的突发性包含了组胺反应，且这些症状与鲭鱼中含有大量组氨酸脱羧酶产生菌有关，也是不容忽视的。虽然这病症的实际机理还在研究之中，但是即使细菌并不是起不可缺少的作用，也对这种病症的发生起了显著的作用。

28.3 致麻痹性贝类中毒

这种病症是由于食用了有毒的蚌类、蛤类、牡蛎或海扇类食品引起的。受这些双壳类动物感染的腰鞭毛藻类会成为含毒食品，其中的链漆钩藻（*Gonyaulax catenella*）是美国太平洋沿岸漆钩藻菌群中的代表菌。在美国北大西洋沿岸和直至北欧地区，所发现的是塔马漆钩藻（*G. tamarensis*），它比链漆钩藻的毒性强；而在英属哥伦比亚发现的是无链漆钩藻（*G. acatenella*）。这些腰鞭毛藻类的大量聚集或繁殖会导致海水中出现“红潮”。这种致麻痹贝类毒素称为“石房蛤毒素”，它的化学结构如下：



石房蛤毒素对人类的致毒作用是导致心血管破裂和呼吸衰竭。它可以不通过去极化作用而阻止神经脉冲的传播，对此，目前尚无治疗的药物。这种毒素对热稳定，水溶性差，一般在烹调过程中不会被分解。在pH3.0的酸性条件下煮沸3～4h可以破坏这种毒素。据报道在软壳蛤中，它在121.1℃下的D值为71.4min[28]。

石房蛤毒素的症状会在摄入软体动物后2h内出现，其症状特征是异感症（兴奋、麻痹或灼烧），这些症状从口腔、嘴唇和舌部开始，然后扩展到面部、头皮和颈部，最后到达手指尖和脚趾。它的致死率差别很大，据报道范围在1%～22%。

在1793—1958年间有记载的病例约有792例，其中173人(22%)死亡[45]。在1973-1987的15年期间，由美国国家卫生部报道至疾病控制中心的中毒事件有19起，平均每起有8例病例。1990年在马萨诸塞州和阿拉斯加州发生的两起事件中有19人中毒。在马萨诸塞州患病的6名渔民是由于食用了煮熟的蛤肉之后中毒的，据检测这种蛤肉中含有4280μg/100g石房蛤毒素[46]。生蛤肉中含有21 400μg/100g石房蛤毒素[47]。在阿拉斯加州中毒的13人中有1人死亡，死者的胃内容物中含有370μg/100g致麻痹蛤类毒素，而在一份被食用的蝶蛤样品中含有2650μg/100g[48]这种毒素。致麻痹蛤类毒素的最高安全限度为80μg/100g[49]。

在美国西海岸，致麻痹蛤类毒素中毒事件似乎发生在5月至10月之间，而在东海岸发生在8月至10月之间。在不存在红潮的情况下，软体动物也可能含有毒性。将软体动物转移到清洁水域可以使它们脱毒，但这需要1个月以上的时间。

28.4 气单胞菌、邻单胞菌和类杆菌

28.4.1 气单胞菌

本属细菌由数个种组成，它们常被发现于胃肠道样品中。这些菌种包括：豚鼠气单孢菌（*A. caviae*）、嗜泉气单孢菌（*A. eucrenophila*）、舒氏气单孢菌（*A. schubertii*）、温和气单孢菌（*A. sobria*）、维罗纳气单孢菌（*A. veronii*）和嗜水气单孢菌（*A. hydrophila*）。人们在豚鼠气单孢菌[50]和嗜水气单孢菌中已经鉴定出了一种肠毒素（见下述），上述其它菌种也与腹泻有关。由于嗜水气单孢菌被研究的最多，所以下述讨论多数是以这种菌为基础。气单孢菌主要是水生细菌，它们常与腹泻有关，但是它们在胃肠炎综合征中的最终的致病机理目前仍不清楚。

嗜水气单孢菌是一种水生细菌，它在咸水中比在淡水中的发现率更高。它是鱼类、海龟、蛙类、螺类和鳄鱼类重要的病原菌，也是人类的病原菌，尤其是抵抗力差的寄主会对它更为敏感。嗜水气单孢菌是猪体内细菌群落的正常成员。它也可能引发腹泻、心内膜炎、脑膜炎、软组织感染和菌血症。

嗜水气单孢菌的产毒菌株能产生一种 5.2×10^4u 的单链多肽，这种多肽具有肠毒素、细胞毒素和溶血活性。这种多功能分子能与霍乱毒素产生免疫交叉反应[58]，它类似于气杆菌溶血素，它类似于第七部分 22 中讨论的李斯特菌溶血素 O 的一种巯基激活毒素。细胞毒素活性与一种嗜水气单孢菌毒素有关，它能导致 Y-1 肾上腺细胞变圆和合成胆固醇。另据报道，兔回肠弯曲部、乳鼠和中国仓鼠卵巢细胞对这种毒素也能呈现阳性反应[21]。

人们对不同来源的嗜水气单孢菌进行了大量研究。在一项研究中，所试验的 96 份样品中有 66 份（69%）产生了细胞毒素，而来源于腹泻病患者中分离的 40 份分离物中有 32 份（80%）是含有毒素的，但非腹泻人体分离物中只有 41%产生了细胞毒素。多数肠毒素产生菌株呈 VP 试验阳性、溶血素生成阳性、阿拉伯糖同化阴性[7]，在乳鼠试验、Y 1 肾上腺细胞试验和兔回肠循环试验中呈现阳性。在一次对来自腹泻患者 147 份分离物的研究中发现，在采用乳鼠分析法分析时，91%是产肠毒素阳性的，而在 94 份从环境中分离的菌株中只有 70%是产生肠毒素的[8]。上述分离物除了 4 份分离物之外，其余临床分离物都呈兔血红细胞溶解阳性。在来自凯萨皮克湾的 116 份分离样品中，有 71%在 Y-1 肾上腺细胞分析中呈现毒性，这种毒性与赖氨酸脱羧酶和 VP 反应有关[33]。在另一项研究中，来自于人体、动物和下水道的 51 份分离物中有 48 份在兔回肠循环试验中呈阳性反应，试验采用的细胞密度为 10^5 或 10^3 以上，而上述来源的所有菌株的细胞提取物也呈阳性反应[2]。

来源于肉类和肉类制品的分离物一般具有其它菌种中产毒菌株的生化特性，对于多数用以试验的菌株，对老鼠的 LD_{50} 值为 $10^8\sim10^9$[54]。后一组研究者认为，免疫缺陷状态对于涉及食品的这种菌的感染可能是很重要的，这种设想能够解释为什么要确诊该微生物是食物中毒胃肠炎的惟一病原菌是困难的。

关于生长温度和生态方面的调查发现，在13株菌中有7株可以在0～5℃下生长，4株可以在10℃下生长，有1株的最低生长温度为15℃[59]。其中嗜冷的菌株最适生长温度为15～20℃。某些菌株的最高生长温度为40～45℃，而最适生长温度为35℃[27]。上述147株菌除了12株之外，所有菌株都栖息在流水或静水水域中[27]。在4处未发现这些微生物的地方是盐分过高的湖泊或温度过高的温泉中。某些水域中的含菌数高达9000/mL。在一份对凯萨皮克湾嗜水气单孢菌生态的研究中发现，这种菌在水中的含量从不足0.3/L至5×10^3/mL，在沉积物中约为4.6×10^2/g[53]。这种菌的存在数量与环境中的细菌总量、好氧细菌数、自养和异养细菌数都有关，它的存在量随溶氧量和盐浓度的升高而降低，它能够生长的上限盐浓度约为15%。它在冬季发现的数量比在夏季的少。

28.4.2　邻单孢菌

类志贺邻单孢菌被发现于水面和土壤表面，它们曾经被从鱼类、贝类、其它水生动物和一些陆地肉用动物中分离出来。它与嗜水气单孢菌一个不同之处在于，它的DNA中的（G+C）含量为51%，而嗜水气单孢菌的含量为58%～62%。这种菌曾被许多研究者从腹泻患者的粪便中分离出来，它也与人类的其它一般性感染有关。它能产生耐热性肠毒素，其O：17血清组菌株能与D组志贺氏菌的抗血清发生反应[71]。在对来源于肠道疾病患者的16株菌株的研究中，类志贺邻单孢菌并不总是能与刚果红结合，这些菌株对于HEp-2细胞是非入侵性的，它们在维罗细胞上也不产生志贺类毒素[1]。虽然这种菌可以稳定地产生一种低水平的细胞溶解素，但是它们对于断乳的瑞士老鼠的LD_{50}值为3.5×10^9。这16株菌都不能产生耐热型肠毒素，所以这些研究者得出的结论是，这种微生物具有一种较低的致病能力[71]。

Zajc Satler等人[70]从6名腹泻患者粪便中分离出了类志贺邻单孢菌，据认为它是这种腹泻症的病原菌，虽然沙门氏菌也被从2名患者粪便中分离出来。在1973—1974年间，在日本大阪发生了急性腹泻症流行事件，其中从患者粪便中分离出的病原细菌只有类志贺邻单孢菌。在1973年的事件中，所涉及的2141人中有978人患病，其中有88%的人出现腹泻、82%出腹腹绞痛、22%的人发热、13%的人出现头痛[64]。患病的症状延续了2～3d。在化验的124份粪便样品中，有21份检测出了类志贺邻单孢菌O17：H2。当时从自来水中也分离出了同样的血清型。在1974年的事件中，35人中有24人患病，所涉及的症状与上述症状类似。从8份化验样品中的3份中分离出了类志贺邻单孢菌血清型O24：H5，而且培养物基本上处于“纯培养状态”[64]。这种微生物还被从342份水样和污泥样品的39%样品中分离出来，也曾经被从鱼类、贝类和蠕螺中分离出来。

一名患胃肠炎的15岁少女在服用了甲氧苄胺嘧啶-磺胺嘧啶片之后，从她的血液中可以分离出类志贺邻单孢菌[56]。这一组研究者注意到，在前述已知患类志贺邻单孢菌感染的12名患者中，有10名是有免疫缺陷或其它类似状况的病人。上述15岁少女在发病时发热至39℃，1d的水便腹泻达到了10次。上述分离的菌株能与腹泻志贺菌血清型7的抗血清反应，从而被划分在类志贺邻单孢菌O组第22位[55]。

类志贺邻单孢菌曾经被观察到能在10℃下生长[59]，来源于扎伊尔水域中的59份鱼类样品中有59%含有这种微生物[66]，在后一项研究中，这种微生物在河流鱼类中比在湖

泊鱼类中发现得更多。它们似乎不产生肠毒素，因为在29份分离物中只有4份在兔回肠循环试验中呈现阳性反应[60]。虽然食品导致的这种菌病流行事件至今尚未见报道，但这种微生物至少在两起事件中被查出是致病的根源[47]。

28.4.3 脆弱拟杆菌

脆弱拟杆菌是严格厌氧的革兰氏阴性细菌，它是食物中毒潜在的病原菌，因为它能产生一种兔回肠循环试验呈阳性的肠毒素，它也与嗜水气单孢菌和类志贺邻单孢菌一样通常与人类的腹泻症有关。这种菌产生肠毒素的能力最早在1984年得到了证实，脆弱拟杆菌的肠毒素产生菌株最早涉及到人类腹泻是在1987年。

据估计，脆弱拟杆菌在人类肠道菌群中占1%～2%。作为一种不产孢子的细菌，它比梭状芽孢杆菌对好氧环境更为敏感，所以它至今未能被从城市下水道中分离出来。这种菌与其它拟杆菌不同之处在于它呈触酶阳性，与其它拟杆菌相同之处在于它能在含有20%胆汁的环境中生长。

脆弱拟杆菌肠毒素是一种相对分子质量约为20 000的单链分子。它与典型的细菌肠毒素不同之处在于它是一类与锌结合的金属蛋白酶，称为“金属锌毒蛋白”。这种肠毒素具有很宽范围的蛋白质底物，它也能自溶。它对肠道的损害被认为是由于它的蛋白质分解能力，至少部分是这种原因。它能与羊羔和其它动物的回肠弯曲部位发生阳性反应（有关这方面的详细信息可以参阅文献48，52）。

由于这种病原菌只是在约50%的美国食物中毒事件的中被鉴定出来，所以前述未知菌株显然也应该包括在内。脆弱拟杆菌与肺炎克雷伯菌[37]和阴沟肠杆菌[38]一起应该引起更多的重视。后两种菌能产生与大肠杆菌耐热型肠毒素类似的耐热型肠毒素，它们对食品污染的潜在作用已经有报道[55]。

参 考 文 献

[1] Abbott, S. L., R. P. Kokka, and J. M. Janda. 1991. Laboratory investigations on the low pathogenic potential of *Plesiomonas shigelloides*. *J. Clin. Microbiol.* 29: 148～153.

[2] Annapurna, E., and S. C. Sanyal. 1977. Enterotoxicity of *Aeromonas hydrophila*. *J. Med. Microbiol.* 10: 317～323.

[3] Appleton, H., and M. S. Pereira. 1977. A possible virus aetiology in outbreaks of foodpoisoning from cockles. *Lancet* 1: 780～781.

[4] Atmar, R. L., F. H. Neill, J. L. Romalde, F. L. Guyader, C. M. Woodley, T. G. Metcalf, and M. K. Estes. 1995. Detection of Norwalk virus and hepatitis A virus in shellfish tissues with the PCR. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 3014～3018.

[5] Behling, A. R., and S. L. Taylor. 1982. Bacterial histamine production as a function of temperature and time of incubation. *J. Food Sci.* 47: 1311～1314, 1317.

[6] Blackwell, J. H., D. Rickansrud, P. D. McKercher, and J. W. McVicar. 1982. Effect of thermal processing on the survival of foot-and-mouth disease virus in ground meat. *J. Food Sci.* 47: 388～392.

[7] Burke, V., J. Robinson, H. M. Atkinson, and M. Gracey. 1982. Biochemical characteristics of enterotoxigenic *Aeromonas* spp. *J. Clin. Microbiol.* 15: 48～52.

[8] Burke, V., J. Robinson, M. Cooper, J. Beamon, K. Partridge, D. Peterson, and M. Gracey. 1984. Biotyping and virulence factors in clinical and environmental isolates of *Aeromonas* species. *Appl. Environ. Microbiol.* 47: 1146～1149.

[9] Centers for Disease Control. 1991. Rotavirus surveillance—United States, 1989—1990. *Morb. Mort. Wkly. Rept.* 40: 80～81, 87.

[10] Centers for Disease Control. 1991. Paralytic shellfish poisoning—Massachusetts and Alaska. 1990. *Mort. Morb. Wkly. Rept.* 40: 157～161.

[11] Centers for Disease Control. 1990. Viral agents of gastroenteritis. Public health importance and outbreak management. *Morb. Mort. Week. Rept.* 39: 1～23.

[12] Centers for Disease Control. 1990. Foodborne hepatitis A—Alaska, Florida, North Carolina, Washington. *Morb. Mort. Week. Rept.* 39: 228～232.

[13] Centers for Disease Control. 1989. Scombroid fish poisoning Illinois, South Carolina. *Morb. Mort. Week. Rept.* 38: 140～142, 147.

[14] Centers for Disease Control. 1987. Outbreak of viral gastroenteritis—Pennsylvania and Delaware. *Morb. Mort. Week. Rept.* 36: 709～711.

[15] Chakraborty, T., M. A. Montenegro, S. C. Sanyal, R. Helmuth, E. Bulling, and K. N. Timmis. 1984. Cloning of enterotoxin gene from *Aeromonas hydrophila* provides conclusive evidence of production of a cytotonic enterotoxin. *Infect. Immun.* 46: 435～441.

[16] Cliver, D. O., R. D. Ellender, and M. D. Sobsey. 1983. Methods for detecting viruses in foods: Background and general principles. *J. Food Protect.* 46: 248～259.

[17] Cliver, D. O. (and the IFT Expert Panel on Food Safety & Nutrition). 1988. Virus transmission via foods. *Food Technol.* 42 (10): 241～248.

[18] Cukor, G., and N. R. Blacklow. 1984. Human viral gastroenteritis. *Microbiol. Rev.* 48: 157～179.

[19] DiGirolamo, R. J. Liston, and J. R. Matches. 1970. Survival of virus in chilled, frozen, and processed oysters. *Appl. Microbiol.* 20: 58～63.

[20] Eyles, M. J., G. R. Davey, and E. J. Huntley. 1981. Demonstration of viral contamination of oysters responsible for an outbreak of viral gastroenteritis. *J. Food Protect.* 44: 294～296.

[21] Frank, H. A., D. H. Yoshinaga, and I. -P. Wu. 1983. Nomograph for estimating histamine formation in skipjack tuna at elevated temperatures. *Mar. Fish. Rev.* 45: 40～44.

[22] Fugate, K. J., D. O. Cliver, and M. T. Hatch. 1975. Enteroviruses and potential bacterial indicators in Gulf Coast oysters. *J. Milk. Food Technol.* 38: 100～104.

[23] Gerba, C. P., and S. M. Goyal. 1978. Detection and occurrence of enteric viruses in shellfish: A review. *J. Food Protect.* 41: 743～754.

[24] Gerba, C. P., S. M. Goyal, R. L. LaBelle, I. Cech, and G. F. Bodgan. 1979. Failure of indicator bacteria to reflect the occurrence of enteroviruses in marine waters. *Amer. J. Pub. Hlth.* 69: 1116～1119.

[25] Gilbert, R. J., G. Hobbs, G. K. Murray, J. G. Cruickshank, and S. E. J. Young. 1980. Scombrotoxic fish poisoning: Features of the first 50 incidents to be reported in Britain (1976—1979). *Brit. Med. J.* 281: 71～72.

[26] Gill, T. A., J. W. Thompson, and S. Gould. 1985. Thermal resistance of paralytic shellfish poison in soft-shell clams. *J. Food Protect.* 48: 659～662.

[27] Hazen, T. C., C. B. Fliermans, R. P. Hirsch, and G. W. Esch. 1978. Prevalence and distribution of *Aeromonas hydrophila* in the United States. *Appl. Environ. Microbiol.* 36: 731～738.

[28] Hejkal, T. W., and C. P. Gerba. 1981. Uptake and survival of enteric viruses in the blue crab, *Callinectes sapidus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 207～211.

[29] Herrmann, J. E., and D. O. Cliver. 1973. Enterovirus persistence in sausage and ground beef. *J. Milk Food Technol.* 36: 426～428.

[30] Hopkins, R. S., G. B. Gaspard, F. P. Williams, Jr., R. J. Karlin, G. Cukor, and N. R. Blacklow. 1984. A community waterborne gastroenteritis outbreak: Evidence for rotavirus as the agent. *Amer. J. Pub. Hlth.* 74: 263～265.

[31] Hudson, S. H., and W. D. Brown. 1978. Histamine (?) toxicity from fish products. *Adv. Food Res.* 24: 113～154.

[32] Hwang, D. -F., S. -H. Chang, C. -Y. Shiau, and C. -C. Cheng. 1995. Biogenic amines in the flesh of sailfish (*Istiophorus platypterus*) responsible for scombroid poisoning. *J. Food Sci.* 60: 926～928.

[33] Kaper, J. B., H. Lockman, R. R. Colwell, and S. W. Joseph. 1981. *Aeromonas hydrophila*: Ecology and toxigenicity on isolates from an estuary. *J. Appl. Bacteriol.* 50: 359～377.

[34] Kaplan, J. E., G. W. Gary, R. C. Baron, N. Singh, L. B. Schonberger, R. Feldman, and H. B. Greenberg. 1982. Epidemiology of Norwalk gastroenteritis and the role of Norwalk virus in outbreaks of acute nonbacterial gastroenteritis. *Ann. Intern. Med.* 96: 756～761.

[35] Kaplan, J. E., R. Feldman, D. S. Campbell, C. Lookabaugh, and G. W. Gary. 1982. The frequency of a Norwalk-like pattern of illness in outbreaks of acute gastroenteritis. *Amer. J. Pub. Hlth.* 72: 1329～1332.

[36] Keswick, B. H., T. K. Satterwhite, P. C. Johnson, H. L. DuPont, S. L. Secor, J. A. Bitsura, G. W. Gary, and J. C. Hoff. 1985. Inactivation of Norwalk virus in drinking water by chlorine. *Appl. Environ. Microbiol.* 50: 261～264.

[37] Klipstein, F. A., and R. F. Engert. 1976. Purification and properties of *Klebsiella pneumoniae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 13: 373～381.

[38] Klipstein, F. A., and R. F. Engert. 1976. Partial purification and properties of *Enterobacter cloacae* heat-stable enterotoxin. *Infect. Immun.* 13: 1307—1311.

[39] Konowalchuk, J., and J. I. Speirs. 1975. Survival of enteric viruses on fresh vegetables. *J. Milk Food Technol.* 38: 469～472.

[40] Konowalchuk, J., and J. I. Speirs. 1975. Survival of enteric viruses on fresh fruit. *J. Milk Food Technol.* 38: 598～600.

[41] Kostenbader, K. D., Jr., and D. O. Cliver. 1977. Quest for viruses associated with our food supply. *J. Food Sci.* 42: 1253～1257, 1268.

[42] Kuritsky, J. N., M. T. Osterholm, J. A. Korlath, K. E. White, and J. E. Kaplan. 1985. A statewide assessment of the role of Norwalk virus in outbreaks of food-borne gastroenteritis. *J. Infect. Dis.* 151: 568.

[43] Landry, E. F., J. M. Vaughn, T. J. Vicale, and R. Mann. 1982. Inefficient accumulation of low levels of monodispersed and feces-associated poliovirus in oysters. *Appl. Environ. Microbiol.*

44: 1362～1369.

[44] Larkin, E. P. 1981. Food contaminants viruses. *J. Food Protect.* 44: 320～325.

[45] McFarren, E. F., M. L. Shafer, J. E. Campbell, K. H. Lewis, E. T. Jensen, and E. J. Schantz. 1960. Public health significance of paralytic shellfish poison. *Adv. Food Res.* 10: 135～179.

[46] McKercher, P. D., W. R. Hess, and F. Hamdy. 1978. Residual viruses in pork products. *Appl. Environ. Microbiol.* 35: 142～145.

[47] Miller, M. L., and J. A. Koburger. 1985. *Plesiomonas shigelloides*: An opportunistic food and waterborne pathogen. *J. Food Protect.* 48: 449～457.

[48] Moncrief, J. S., R. Obiso, Jr., L. A. Barroso, J. J. Kling, R. L. Wright, R. L. Van Tassel, D. M. Lyerly, and T. D. Wilkins. 1995. The enterotoxin of *Bacteroides fragilis* is a metalloprotease. *Infect. Immun.* 63: 175～181.

[19] Murphy, A. M., G. S. Grobmann, P. J. Christopher, W. A. Lopez, G. R. Davey, and R. H. Millsom. 1979. An Australia-wide outbreak of gastroenteritis from oysters caused by Norwalk virus. *Med. J. Austr.* 2: 329～333.

[50] Namdari, H., and E. J. Bottone. 1990. Cytotoxin and enterotoxin production as factors delineating enteropathogenicity of *Aeromonas caviae*. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1796～1798.

[51] Niven, C. F., Jr., M. B. Jeffrey, and D. A. Corlett, Jr. 1981. Differential plating medium for quantitative detection of histamine-producing bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 41: 321～322.

[52] Obiso, R. J., Jr., D. M. Lyerly, R. L. Van Tassell, and T. D. Wilkins. 1995. Proteolytic activity of the *Bacteroides fragilis* enterotoxin causes fluid secretion and intestinal damage in vivo. *Infect. Immun.* 63: 3820～3826.

[53] Omura, Y., R. J. Price, and H. S. Olcott. 1978. Histamine-forming bacteria isolated from spoiled shipjack tuna and jack mackerel. *J. Food Sci.* 43: 1779～1781.

[54] Palumbo, S. A., M. M. Bencivengo, B. Del Corral, A. C. Williams, and R. L. Buchanan. 1989. Characterization of the *Aeromonas hydrophila* group isolated from retail foods of animal origin. *J. Clin. Microbiol.* 27: 854～859.

[55] Paul, R., A. Siitonen, and P. Karkkainen. 1990. *Plesiomonas shigelloides* bacteremia in a healthy girl with mild gastroenteritis. *J. Clin. Microbiol.* 28: 1445～1446.

[56] Portnoy, B. L., P. A. Mackowiak, C. T. Caraway, J. A. Walker, T. W. McKinley, and C. A. Klein. 1975. Oyster-associated hepatitis: Failure of shellfish certification programs to prevent outbreaks. *J. Amer. Med. Assoc.* 233: 1065～1068.

[57] Rodriguez-Jerez, J. J., E. I. Lopez-Sabater, A. X. Roig-Sagues, and M. T. Mora-Ventura. 1994. Histamine, cadaverine and putrescine forming bacteria from ripened Spanish semipreserved anchovies. *J. Food Sci.* 59: 998.

[58] Rose, J. M., C. W. Houston, D. H. Coppenhaver, J. D. Dixon, and A. Kurosky. 1989. Purification and chemical characterization of a cholera toxin-cross-reactive cytolytic enterotoxin produced by a human isolate of *Aeromonas hydrophila*. *Infect. Immun.* 57: 1165～1169.

[59] Rouf, M. A., and M. M. Rigney. 1971. Growth temperatures and temperature characteristics of *Aeromonas*. *Appl. Microbiol.* 22: 503～506.

[60] Sanyal, S. C., S. J. Singh, and P. C. Sen. 1975. Enteropathogenicity of *Aeromonas hydrophila*

and *Plesiomonas shigelloides*. *J. Med. Microbiol.* 8: 195～198.

[61] Sullivan, R., R. M. Marnell, E. P. Larkin, and R. B. Read, Jr. 1975. Inactivation of poliovirus 1 and coxsackievirus B-2 in broiled hamburgers. *J. Milk Food Technol.* 38: 473～475.

[62] Taylor, S. L., L. S. Guthertz, M. Leatherwood, and E. R. Lieber. 1979. Histamine production by *Klebsiella pneumoniae* and an incident of scombroid fish poisoning. *Appl. Environ. Microbiol.* 37: 274～278.

[63] Taylor, S. L., T. J. Keefe, E. S. Windham, and J. F. Howell. 1982. Outbreak of histamine poisoning associated with consumption of Swiss cheese. *J. Food Protect.* 45: 455～457.

[64] Tsukamoto, T., Y. Konoshita, T. Shimada, and R. Sakazaki. 1978. Two epidemics of diarrhoeal disease possibly caused by *Plesiomonas shigelloides*. *J. Hyg.* 80: 275～280.

[65] Twedt, R. M., and B. K. Boutin. 1979. Potential public health significance of non-*Escherichia coli* coliforms in food. *J. Food Protect.* 42: 161～163.

[66] Van Damme, L. R., and J. Vandepitte. 1980. Frequent isolation of *Edwardsiella tarda* and *Plesiomonas shigelloides* from healthy Zairese freshwater fish: A possible source of sporadic diarrhea in the tropics. *Appl. Environ. Microbiol.* 39: 475～479.

[67] Wait, D. A., C. R. Hackney, R. J. Carrick, G. Lovelace, and M. D. Sobsey. 1983. Enteric bacterial and viral pathogens and indicator bacteria in hard shell clams. *J. Food Protect.* 46: 493～196.

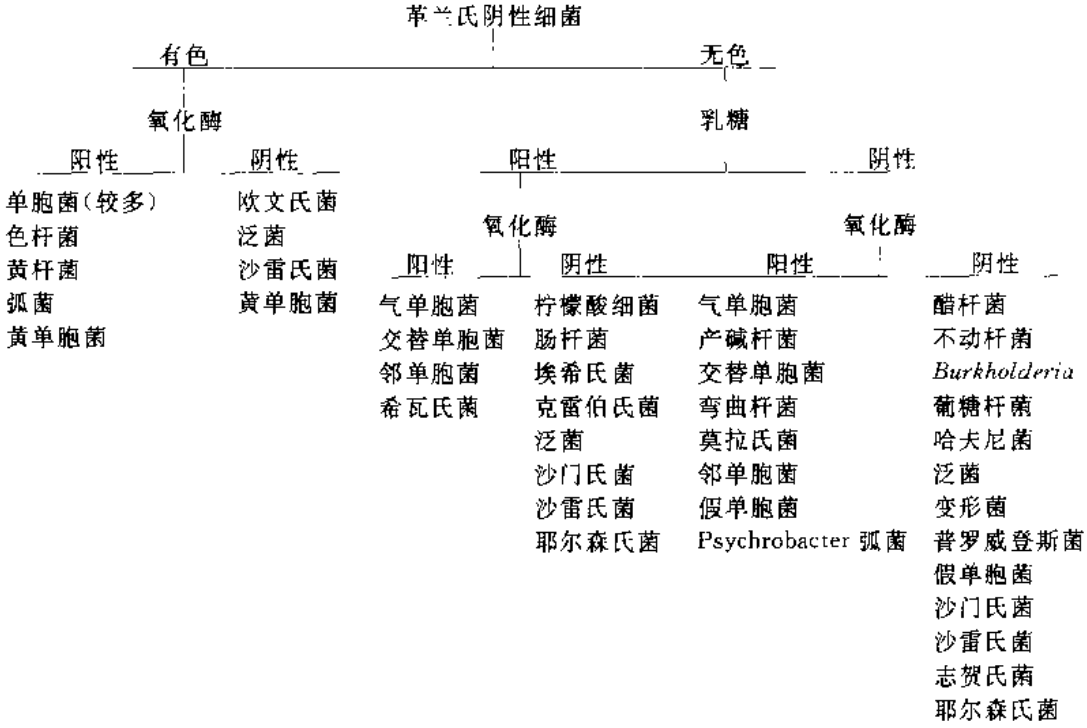
[68] Wei, C. I., C. -M. Chen, J. A. Koburger, W. S. Otwell, and M. R. Marshall. 1990. Bacterial growth and histamine production on vacuum packaged tuna. *J. Food Sci.* 55: 59～63.

[69] Yoshinaga, D. R., and H. A. Frank, 1982. Histamine-producing bacteria in decomposing shipjack tuna (*Katsuwonus pelamis*). *Appl. Environ. Microbiol.* 44: 447～452.

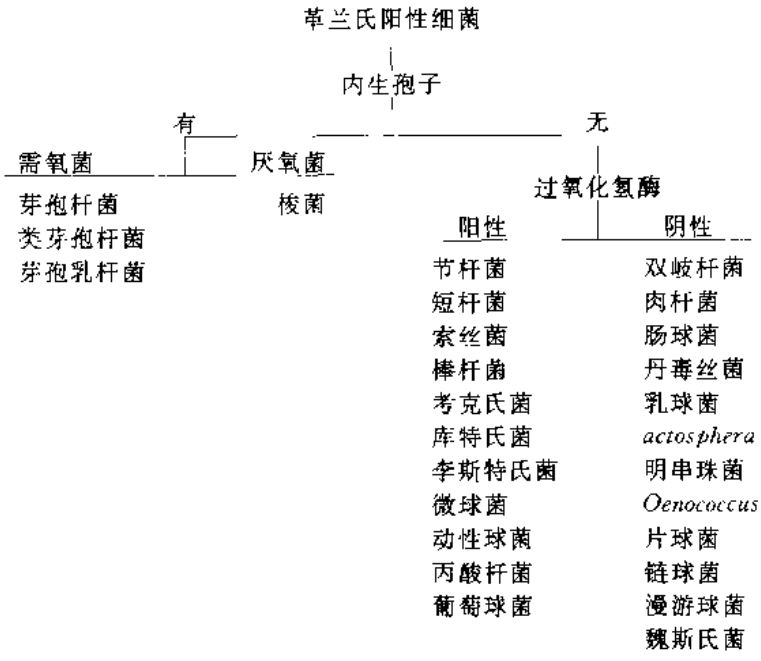
[70] Zajc-Satler, J., A. Z. Dragav, and M. Kumelj. 1972. Morphological and biochemical studies of 6 strains of *Plesiomonas shigelloides* isolated from clinical sources. *Zbt. Baktr. Hyg. Abt. Orig. A.* 219: 514～521.

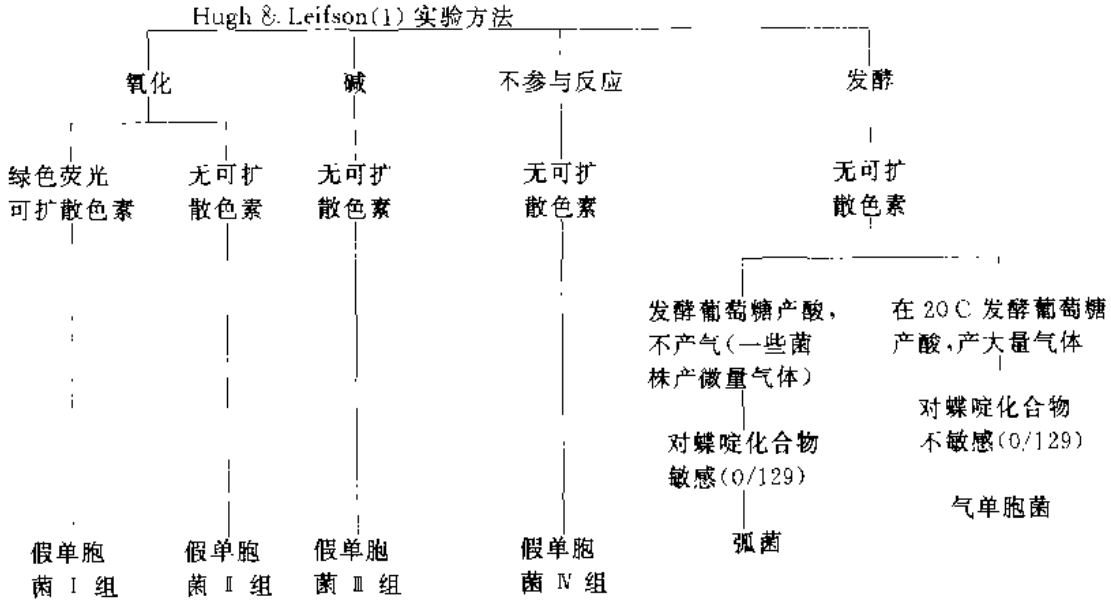
附　录

A. 与食物传染病相关的革兰氏阴性细菌的关系（详细内容参考伯杰氏手册）



B. 与一般食物传染病相关的革兰氏阳性细菌的关系（详细内容参考伯杰氏手册）





在 1960 年，J. M. Sheman，G. Hobbs，和 W. Hodgkiss 之后，建立了用于鉴定某些革兰氏阴性细菌的实验方法，另外参考了 J. Appl. Bacteriol. 23：379--390，假单胞菌科的内容。